

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Stjepan Rakitić

Utjecaj duljine molekule sgRNA na učinkovitost i specifičnost
proteina Cas9 iz vrste *Staphylococcus aureus*

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Aleksandra Vojte i neposrednim vodstvom mag. biol. mol. Vanje Tadić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Iskreno se zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Aleksandru Vojti na strpljenju i podršci tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Od srca se zahvaljujem mag. mol. biol. Vanji Tadić, uz koju sam stekao znanja i vještine potrebne za samostalan rad u laboratoriju. Hvala na trudu, savjetima i potpori.

Veliko hvala mag. mol. biol. Goranu Josipoviću na savjetima i pomoći.

Zahvaljujem se mag. mol. biol. Mariji Klasić na savjetima i pomoći.

Hvala prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš na ukazanom povjerenju da budem dio istraživačke grupe Laboratorija za epigenetiku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj duljine molekule sgRNA na učinkovitost i specifičnost proteina Cas9 iz vrste
Staphylococcus aureus

Stjepan Rakitić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav CRISPR/Cas9, adaptivni imunski sustav prokariota, iskorišten je kao metoda za ciljano uređivanje genoma. Cas9 inaktiviran mutacijama (dCas9) može se koristiti za navođenje efektorskih domena. Ciljani gen moguće je metilirati korištenjem fuzije dCas9-DNMT3A, ili demetilirati sa dCas9-TET1. Problem ovakvih sustava je nespecifična aktivnost izvan ciljnih lokusa, što se može smanjiti korištenjem skraćenih sgRNA. Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj različitih duljina sgRNA na specifičnost sustava za ciljanu promjenu statusa metilacije DNA. Ekspresijske kazete za sgRNA klonirane su u vektore za koekspresiju dCas9-DNMT3A, odnosno dCas9-TET1, kojima je transfecirana stanična linija HEK293. Nakon transfekcije stanična DNA je izolirana te pirosekvencirana nakon bisulfitne konverzije radi određivanja metilacijskog statusa. Skraćivanje molekula sgRNA nije dovelo do statistički značajnog smanjenja nespecifične aktivnosti. Nije utvrđen veći utjecaj skraćivanja molekula sgRNA na nespecifičnu aktivnost u odnosu na specifičnu aktivnost. Optimalna duljina molekule sgRNA za ciljanje gena *LAMB1* i fragment F3 gena *BACH2* je 21 nukleotid te 20 nukleotida za fragment F4 gena *BACH2* i fragment A1 promotora gena *MGAT3*.

(49 stranica, 20 slika, 6 tablica, 26 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: dCas9, DNMT3A, TET1, modificiranje epigenoma, HEK293, metilacija

Voditelj: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta
Neposredni voditelj: mag. biol. mol. Vanja Tadić
Ocjenitelji: Dr. sc. Aleksandar Vojta, doc.
Dr. sc. Damjan Franjević, izv. prof.
Dr. sc. Toni Nikolić, red. prof.

Rad prihvaćen: 21. lipnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Effect of sgRNA length on efficiency and specificity of *Staphylococcus aureus* Cas9 protein

Stjepan Rakitić
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The CRISPR/Cas9 system, originally discovered as adaptive bacterial immunity, had been repurposed as a tool for genome editing. Cas9 rendered inactive by mutations (dCas9) can be used for guiding effector domains. Targeted gene can be methylated using dCas9-DNMT3A fusion, or demethylated using dCas9-TET1. Problem such systems have is non-specific activity beyond targeted genes, which can be reduced using truncated sgRNA. Aim of the study was to determine the effect of different sgRNA lengths on specificity of systems for targeted changing of DNA methylation status. sgRNA expression cassettes were cloned into vectors coexpressing dCas9-DNMT3A and dCas9-TET1 respectively, which were used for transfecting HEK293 cell line. After the transfection DNA was isolated and pyrosequenced after bisulphite treatment to determine methylation status. Truncating sgRNAs didn't result in statistically significant reduction of non-specific activity. Increased influence of truncating sgRNAs on non-specific activity compared to specific activity was not determined. Optimal sgRNA length for targeting F4 fragment of *LAMB1* gene and F3 fragment of *BACH2* gene is 21 nucleotides, and 20 nucleotides for fragment F4 of *BACH2* gene and for A1 fragment of the *MGAT3* gene promotor.

(49 pages, 20 figures, 6 tables, 26 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: dCas9, DNMT3A, TET1, epigenome editing, HEK293, methylation

Supervisor: Dr. Aleksandar Vojta, Asst. Prof.

Assistant supervisor: mag. biol. mol. Vanja Tadić

Reviewers: Dr. Aleksandar Vojta, Asst. Prof.

Dr. Damjan Franjević, Assoc. Prof.

Dr. Toni Nikolić, Prof.

Thesis accepted: June 21, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Sustav CRISPR-Cas9 za ciljanu izmjenu genoma	1
1.2 Cas9 iz bakterije <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.3 Metilacija DNA	3
1.4 dCas9	5
1.5 Ciljana promjena metilacije	6
1.6 Ciljani geni	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	8
3. MATERIJAL I METODE	9
3.1 Materijal	9
3.2 Metode	12
3.2.1 Konstrukcija plazmidnih vektora	12
3.2.2 Održavanje stanica HEK293 u kulturi	16
3.2.3 Transfekcija stanica HEK293 plazmidnim vektorima	16
3.2.4 Izolacija genomske DNA iz transfeciranih stanica HEK293	18
3.2.5 Bisulfitna konverzija izolirane genomske DNA	18
3.2.6 Lančana reakcija polimerazom DNA nakon bisulfitne konverzije	19
3.2.7 Pirosekvenciranje	20
3.2.8. Statistička obrada podataka	22
4. REZULTATI	23
4.1 Konstrukcija rekombinantnih plazmida	23
4.2 Transfekcija stanica HEK293 i izolacija genomske DNA	27
4.3 Pirosekvenciranje	28
5. RASPRAVA	41
6. ZAKLJUČAK	45
7. LITERATURA	46
8. ŽIVOTOPIS	49

POPIS KRATICA

5-caC	5-karboksilcitozin
5-fC	5-formilcitozin
5-hmC	5-hidroksimetilcitozin
5-mC	5-metilcitozin
AM-AR	<i>active modification – active restoration</i>
AM-PD	<i>active modification – passive dilution</i>
BER	popravak izrezivanjem baza, engl. <i>base excision repair</i>
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR-RNA
dCas9	inaktivna nukleaza Cas9, engl. <i>deactivated Cas9</i>
dCas9-DNMT3A	fuzijski konstrukt dCas9 sa katalitičkom domenom DNMT3A
dCas9-TET1	fuzijski konstrukt dCas9 sa katalitičkom domenom TET1
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNMT	DNA metiltransferaza
DTT	ditiotreitol
FBS	goveđi fetalni serum, engl. <i>fetal bovine serum</i>
Gln	glutamin
HDR	popravak homolognom rekombinacijom, engl. <i>homology directed repair</i>
HEK293	stanična linija ljudskih embrionalnih stanica bubrega, engl. <i>human embryonic kidney</i>
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
LB	tekući medij Luria-Bertani
MBD	<i>methyl-CpG-binding domain</i>
NHEJ	sparivanje nehomolognih krajeva, engl. <i>non-homologous end joining</i>
NT	„ <i>non-targeting</i> “
PACE	kontinuirana evolucija pomoću faga, engl. <i>phage-assisted continuous evolution</i>
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PBS	fosfatni pufer, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
Pen/Strep	mješavina antibiotika penicilina i streptomicina
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
TDG	timin DNA glikozilaza, engl. <i>thymine DNA glycosylase</i>
TET	dioksigenaza metilcitozina TET, engl. <i>ten-eleven translocation</i>
tracrRNA	<i>trans-activating RNA</i>
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

1. UVOD

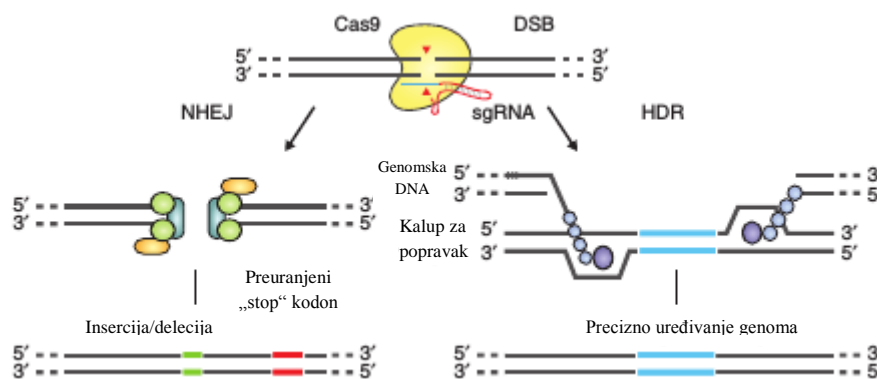
1.1 Sustav CRISPR-Cas9 za ciljanu izmjenu genoma

Sustav CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) adaptivni je imunski sustav prokariota. Funkcionira analogno stečenoj imunosti kralježnjaka, stvaranjem zapisa o prethodnoj zarazi koji koristi u slučaju ponovne zaraze. Postoje sličnosti s eukariotskom RNA interferencijom. Temelji se na nukleazama navođenim molekulama RNA koje cijepaju strane nukleinske kiseline. Sastoji se od skupine gena *cas* i lokusa CRISPR. Geni *cas* kodiraju za proteinske komponente koje sudjeluju mehanizmu djelovanja sustava. Lokus CRISPR građen je od ponavljajućih sekvenci dugih 20-50 parova baza odvojenih „*protospacer*“ sljedovima porijeklom iz virusa ili stranih plazmida.

Mehanizam djelovanja sustava CRISPR-Cas dijeli se u tri faze: adaptacija, ekspresija crRNA i interferencija. Adaptacija je proces prepoznavanja, procesiranja i ugradnje strane DNA u lokus CRISPR u obliku nove razmaknice (novog „*spacer*“ slijeda). U procesu adaptacije sudjeluju proteini Cas1 i Cas2. Ekspresija crRNA uključuje transkripciju lokusa CRISPR u obliku pre-crRNA te njenog procesiranja u zrele crRNA koje sadrže pojedinačne razmaknice. Zatim u fazi interferencije navođenjem efektorskog kompleksa na temelju komplementarnosti razmaknice crRNA dolazi do prepoznavanja i uništavanja strane sekvence. Za efikasno vezanje kompleksa za stranu nukleinsku kiselinu potrebna je sekvenca PAM (engl. „*protospacer adjacent motif*“) koja je različita za svaki sustav CRISPR-Cas. Sekvenca PAM ne nalazi se u lokusima CRISPR te je zbog toga onemogućeno cijepanje sekvenci unutar njih.

Sustavi CRISPR-Cas se mogu podijeliti u 6 tipova grupiranih u 2 klase. Efektorski kompleksi sustava klase 1 (tipovi I, III i IV) građeni su od više podjedinica, dok su efektorski kompleksi sustava klase 2 (tipovi II, V i VI) građeni od jedne podjedinice (Wright i sur., 2016).

Sustav CRISPR-Cas9 je najbolje opisani i najviše proučavani sustav CRISPR-Cas tipa II. Kod primjene sustava CRISPR-Cas9 u genomskom inženjerstvu, odnosno uređivanju genoma eukariotskih organizama, nukleaza Cas9 uvodi dvolančane lomove na točno određeno mjesto u genomu. Nastali dvolančani lomovi mogu se popraviti nepreciznim nehomolognim sparivanjem krajeva (NHEJ) čime nastaju nasumične insercije i delecije, ili preciznim popravkom homolognom rekombinacijom (HDR) uz egzogenu DNA čime dolazi do specifičnih insercija, delecija ili substitucija (Slika 1).



Slika 1. Dvolančani lomovi potiču izmjenu genoma. Dvolančani lomovi uzrokovani proteinom Cas9 (žuto) mogu biti popravljani na dva načina. Kod popravka sklonog pogreškama (NHEJ, engl. „*Non-homologous end joining*“), krajevi nastali dvolančanim lomom popravljaju se i ponovno spajaju endogenim sustavom za popravak DNA, što može rezultirati nasumičnim delecijama na mjestu spoja. Delecije u kodirajućim regijama gena mogu izazvati pomake u okviru čitanja čime nastaje preuranjeni "stop" kodon, čime se dokida funkcija gena. Drugi način je popravak homolognom rekombinacijom (HDR, engl. „*Homology directed repair*“), koji se koristi za precizno uređivanje genoma dodavanjem DNA u obliku plazmida (Preuzeto i prilagođeno iz Ran i sur., 2013).

Za ciljanu izmjenu genoma sustavima tipa II u eukariotsku stanicu ili organizam je potrebno uvesti nukleazu Cas9 i kimernu sgRNA (engl. „*single guide RNA*“) stvorenu fuzijom crRNA i tracrRNA (engl. „*transactivating CRISPR RNA*“). U sustavima tipa II tracrRNA pomaže pri sazrijevanju pre-crRNA i veže se sa crRNA kako bi se stvorio kompleks s nukleazom Cas9. Oko 20 nukleotida na 5' kraju sgRNA usmjeravaju Cas9 na specifično mjesto na DNA pomoću komplementarnosti RNA-DNA. Ciljna sekvenca treba biti neposredno uz 5' kraj sekvence PAM. Mijenjanjem sekvence 20 nukleotida na 5' kraju molekule sgRNA omogućeno je relativno jednostavno određivanje mjesta vezanja kompleksa unutar genoma. Različiti sustavi CRISPR-Cas prepoznaju različite sekvence PAM i koriste različite molekule crRNA i tracrRNA.

Transkripcija molekula sgRNA u eukariotskoj stanici postiže se korištenjem promotora RNA polimeraze III, kao što je promotor U6. Transkripti RNA polimeraze III nemaju 5' metilgvanozinsku kapu ni 3' poliadenilirani rep te ne izlaze iz jezgre. Promotor U6 zahtijeva gvanin na 5' kraju sgRNA. Ukoliko sekvenca sgRNA nema gvanin na 5' kraju potrebno ga je dodati. Cas9 se prepisuje s promotora za RNA polimerazu II (Ran i sur., 2013; Sander i Joung, 2014).

1.2 Cas9 iz bakterije *Staphylococcus aureus*

Ortolozni proteini Cas9 iz različitih vrsta bakterija razlikuju se veličinom. Pri uvođenju sustava u željeni stanični tip ili organizam poželjno je da je čitav konstrukt što manji, kako bi se dobilo više prostora za fuzionirane efektorske domene te kontrolne elemente. Zbog toga je poželjno da je protein Cas9 što manji, a da pri tome ima i visoku učinkovitost. Cas9 iz bakterije *Staphylococcus aureus* je ortolog koji se pokazao kao idealan kandidat s obzirom na veličinu i učinkovitost. Sekvence PAM za ovaj sustav su NNGRRT ili NNGRR(N) (N označava bilo koji nukleotid, R označava purin) (Ran i sur., 2015).

1.3 Metilacija DNA

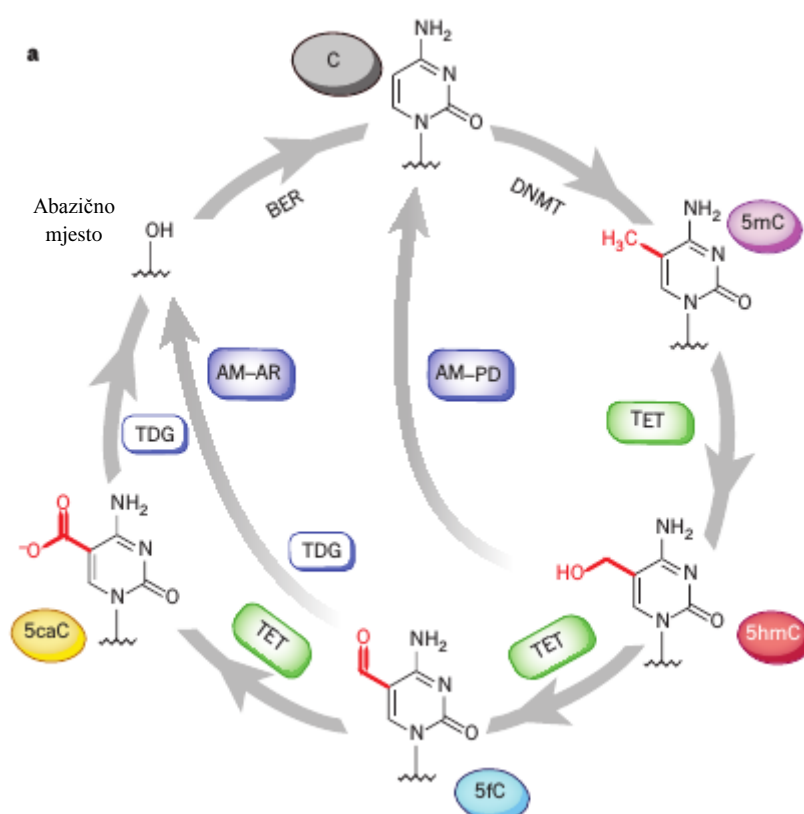
Razina ekspresije gena u stanici kontrolira se epigenetičkim mehanizmima. U epigenetičke mehanizme ubrajamo metilaciju DNA, posttranslacijske modifikacije histona, uvođenje histonskih varijanti, pozicioniranje nukleosoma (Portella i Esteller, 2010) i nekodirajuće RNA molekule (Holoch i Moazed, 2015). Metilacija DNA je proces dodavanja metilne skupine na molekulu DNA. Kod čovjeka se odvija gotovo isključivo na citozinima CpG dinukleotida. CpG dinukleotidi se grupiraju u regije koje se nazivaju CpG otoci. CpG otoci su prisutni u otprilike 70% promotora gena. Većina ih je nemetilirana u stanicama, a neki su metilirani samo u stanicama određenih tkiva (Deaton i Bird, 2011). Metilacija DNA u CpG otocima genskih promotora u pravilu uzrokuje utišavanje gena. U proces utišavanja uključeni su proteini koji se vežu na metilnu skupinu MBD (engl. „*methyl-CpG-binding-domain*“) koji dovode komplekse za remodeliranje kromatina i modifikaciju histona na metilirano mjesto. Ako DNA nije metilirana, dolazi do vezanja proteina Cpfl koji dovodi histonsku metiltransferazu Setd1 što rezultira trimetilacijom histona H3K4 i aktivacijom transkripcije (Lauberth i sur., 2013).

Osim u CpG otocima, metilacija DNA se pojavljuje i na „obalama“ CpG otoka. To su mjesta s manjom gustoćom CpG dinukleotida u neposrednoj blizini CpG otoka. Metilacija na obalama CpG otoka najčešće uzrokuje smanjenje transkripcije. Pretpostavlja se da se većina tkivno specifične metilacije odvija upravo u tim regijama (Portella i Esteller, 2010).

Enzimi koji uvode i održavaju metilaciju DNA katalizom prijenosa metilne skupine sa S-adenozil metionina na DNA su DNA metiltransferaze DNMT (engl. „*DNA methyltransferase*“). Pet je članova obitelji DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B i DNMT3L. Metiltransferaznu aktivnost posjeduju DNMT1, DNMT3A i DNMT3B. DNMT3 su *de novo* metiltransferaze, dok je DNMT1 DNA metiltransferaza koja održava obrasce

metilacije. DNMT3L nema katalitičku aktivnost, nego potiče aktivnost DNMT3A i DNMT3B s kojima interagira i kolokalizira u jezgri (Lyko, 2018).

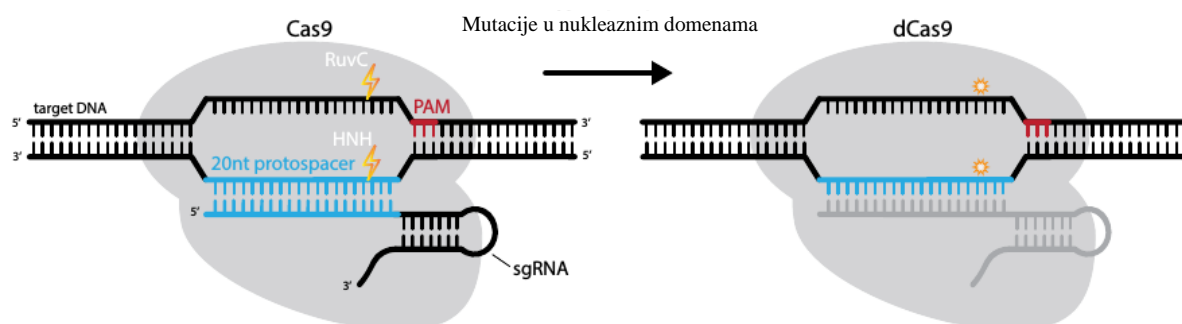
Demetilacija DNA se može odvijati pasivno i aktivno. U procesu aktivne demetilacije DNA sudjeluju dioksidgenaze metilcitozina iz obitelji TET (engl. „*Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*“). Proteini TET kataliziraju oksidaciju 5-metilcitozina (5mC) u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC), zatim u 5-formilcitozin (5fC) te konačno u 5-karboksilcitozin (5caC). U slučaju 5hmC metilacija se gubi tokom replikacije, dok je kod 5fC i 5caC gubitak metilacije rezultat djelovanja timin DNA glikozilaze TDG (engl. „*thymine DNA glycosylase*“) kroz popravak izrezivanjem baza (Slika 2) (Wu i Zhang, 2017).



Slika 2. Putevi demetilacije metilcitozina. 5mC uvedeni DNA metiltransferazama uzastopno se oksidiraju u 5-hidroksimetilcitozin (5hmC), 5-formilcitozin (5fC) i 5-karboksilcitozin (5caC) dioksidgenazom metilcitozina TET. 5hmC se vraća u prvobitni citozin aktivnom modifikacijom i nestankom pasivno kroz replikaciju AM-PD (engl. „*Active modification, Passive dilution*“) putem. 5fC i 5caC se izrežu timin DNA glikozilazom (TDG) te se mjesto bez baze popravljiva u sklopu popravka izrezivanjem baza BER (engl. „*base excision repair*“) čime se aktivno vraćaju u prvobitni citozin kroz put AM-AR (engl. „*Active modification, Active restoration*“) (Preuzeto i prilagođeno iz Kohli i Zhang, 2013).

1.4 dCas9

Nukleaza Cas9 ima dvije nukleazne domene (RuvC i HNH) kojima cijepa lance molekule DNA pri stvaranju dvolančanog loma. Uvođenje točkastih mutacija D10A u RuvC domeni (zamjena aspartata u alanin na poziciji 10) i N580A u HNH domeni (zamjena asparagina u alanin na poziciji 580) proteina Cas9 iz vrste *Staphylococcus aureus* (Slika 3) rezultira nastankom katalitički inaktivne varijante dCas9 („dead“ Cas9) (Nishimasu i sur., 2015).



Slika 3. Endonukleaza Cas9 i njena varijanta s dokinutom nukleaznom aktivnošću (dCas9). dCas9 nastaje mutacijama u nukleaznim domenama proteina Cas9 (D10A u domeni RuvC, N580A u domeni HNH Cas9 iz vrste *Staphylococcus aureus*). Takav protein može se vezati za ciljnu sekvencu, ali je ne može pocijepati (Preuzeto i prilagođeno iz Brocken i sur., 2018).

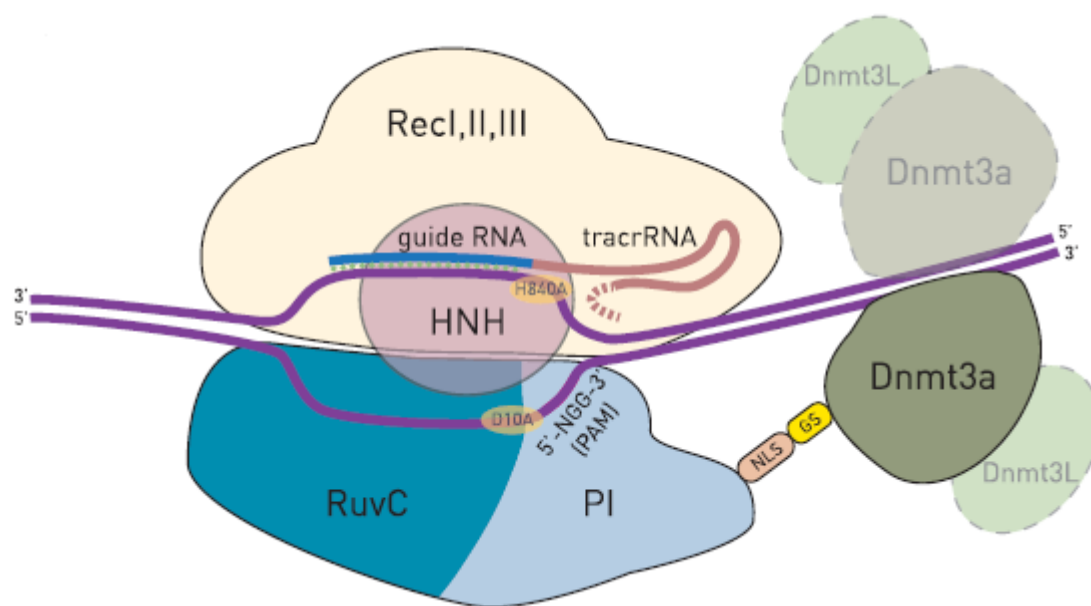
Fuzioniranjem različitih efektorskih domena s katalitički inaktivnim proteinom dCas9 omogućena je regulacija transkripcije i uređivanje epigenoma na točno određenim sekvencama u genomu. Konstrukti dobiveni fuzioniranjem dCas9 s efektorskim domenama mogu biti transkripcijski faktori ili epigenetički modifikatori (Brocken i sur., 2018).

1.5 Ciljana promjena metilacije

Fuzijskim konstruktima dCas9-DNMT3A i dCas9-TET1 navođenih specifičnim molekulama sgRNA moguće je promijeniti razinu metilacije na ciljanim lokusima u genomu.

Katalitičke domene DNMT3A i TET1 fuzionirane su na N-terminalni kraj dCas9 kratkim fleksibilnim linkerom Gly₄Ser (Slika 4) kako bi se mijenjala metilacija uz mjesto vezanja sgRNA (Vojta i sur., 2016).

Osim katalitički aktivnih domena, za dCas9 mogu se vezati i katalitički inaktivne domene DNMT3A-ANV i DED1. DNMT3A-ANV inaktivna domena dobivena je mutacijom E155A (zamjena glutamata u alanin na poziciji 155) u aktivnom mjestu DNMT3A, a DED1 inaktivna domena mutacijama H1652Y/D1654A (zamjena histidina u tirozin na poziciji 1652; zamjena aspartata u alanin na poziciji 1654) u aktivnom mjestu TET1. Konstrukti s katalitički inaktivnim domenama služe kao negativne kontrole.



Slika 4. Shematski prikaz fuzijskog konstrukta dCas9-DNMT3A. Molekula sgRNA vezana je u žlijebu između reznja za prepoznavanje (domene RecI, II i III) i nukleaznog reznja (domene HNH, RuvC i PI) proteina Cas9. Domena PI (engl. „*PAM-interacting domain*“) prepoznaje sekvencu PAM. Katalitička domena proteina DNMT3A vezana je preko jezgrinog lokalizacijskog signala NLS (engl. „*Nuclear Localization Signal*“) i pentapeptidne poveznice GS (peptid od četiri glicina i jednog serina). U *in vivo* uvjetima katalitička domena DNMT3A dimerizira s endogenim proteinom DNMT3A i proteinima DNMT3L (Preuzeto iz Vojta i sur., 2016).

Problem sustava baziranih na proteinu Cas9 je njihovo nespecifično vezanje i aktivnost na neželjenim mjestima u genomu (engl. „*off-target*“). Jedan od načina smanjenja nespecifične aktivnosti je korištenje skraćenih molekula sgRNA. Skraćivanjem sgRNA povećava se osjetljivost na nekomplementarno sparivanje baza i specifičnost vezanja (Fu i sur., 2014).

1.6 Ciljani geni

U ovom istraživanju ciljani su geni *BACH2*, *LAMB1* i *MGAT3*. Ovi geni povezani su s N-glikozilacijom imunoglobulina G (IgG). Ovisno o tome kako je glikozilirani IgG, njegova funkcija može biti upalna ili proutupalna. Promjene u ovim genima povezane su s autoimunim i upalnim procesima (Lauc i sur., 2013).

Gen *BACH2* (*BTB Domain And CNC Homolog 2*) kodira za transkripcijski faktor BACH2 specifičan za B limfocite. Pokazano je da upravlja transkripcijskom aktivnošću B limfocita te tako regulira njihovo sazrijevanje (Shinnakasu i sur., 2016).

Gen *LAMB1* (*Laminin Subunit Beta 1*) kodira za izoformu beta lanca laminina 1. Laminini su proteini građeni od 3 različita lanca: alfa, beta i gama. Imaju ulogu u staničnoj adheziji, diferencijaciji, migraciji, staničnoj signalizaciji te metastaziranju (Domogatskaya i sur., 2012).

Gen *MGAT3* (*Mannosyl (Beta-1,4)-Glycoprotein Beta-1,4-N Acetyl-Glucosaminyltransferase*) kodira za glikoziltransferazu MGAT3. MGAT3 prenosi N-acetilglukozamin (GlcNAc) na beta-vezanu manozu trimanozilne srži N-vezanog oligosaharida pri čemu nastaje rasijecajući GlcNAc. N-glikan s rasijecajućim GlcNAc nije supstrat za ostale glikoziltransferaze te se tako zaustavlja daljnje procesiranje i elongacija (Takahashi i sur., 2009).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj duljina sgRNA od 21, 20 i 18 nukleotida na aktivnost i specifičnost sustava za ciljanu promjenu metilacije DNA dCas9-DNMT3a i dCas9-TET1. Dodatni cilj je provjeriti može li se pristup skraćenih sgRNA pokazan na proteinu Cas9 iz bakterije *Streptococcus pyogenes* podjednako uspješno primijeniti na ortolog Cas9 iz bakterije *Staphylococcus aureus*. Istraživanja su pokazala da skraćivanje sgRNA smanjuje nespecifično vezanje kompleksa Cas9/sgRNA te posljedično dovodi do smanjene nespecifične aktivnosti, bez gubitka specifične aktivnosti. Također je pokazano da je utjecaj skraćivanja sgRNA na nespecifičnu aktivnost veći od utjecaja na specifičnu aktivnost.

Specifični ciljevi:

- konstrukcija plazmidnih vektora za ciljanu metilaciju gena *BACH2* i ciljanu demetilaciju gena *LAMB1* i *MGAT3* kloniranjem sekvenci molekula sgRNA u vektore
- transfekcija stanica HEK293 plazmidnim konstruktima
- izolacija i bisulfitna konverzija ukupne genomske DNA
- umnažanje i analiza razine metilacije bisulfitno konvertirane DNA
- određivanje razlika u razini metilacije ciljanih gena u stanicama HEK293 transfeciranih konstruktima sa sgRNA od 21 nt u odnosu na sgRNA od 20 nt i 18 nt

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Materijal

Bakterijski soj:

Escherichia coli XL-10 Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD)

Enzimi:

BpiI (BbsI) (10 U/μL; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

DNA ligaza T4 (350 U/μL; TaKaRa, Kyoto, Japan)

Egzonukleaza V (10 000 U/mL; New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)

Polinukleotid kinaza T4 (10 000 U/mL; New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)

Proteinaza K (20 mg/mL; Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)

Komercijalni setovi reagensa:

EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Irvine, Kalifornija, SAD)

Lipofectamine™ 3000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

PyroMark PCR Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka)

PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (Qiagen, Hilden, Njemačka)

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, SAD)

Ostalo:

Agaroz (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)

Adenozin trifosfat (10 mM; New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)

Ampicilin (100mg/mL; BioChemica, Darmstadt, Njemačka)

Ditiotreitol (10 mM; Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

Fetalni goveđi serum (FBS, engl. *fetal bovine serum*; Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)

Fluorescentna interkalatorska boja SYBR™ Safe (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

Fosfatni pufer PBS (engl. „*Phosphate-buffered saline*“; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; pH 7,4)

Izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid IPTG (100 mM; ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

L-glutamin (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, SAD)

Luria-Bertani (LB) tekući medij (10 g/L ekstrakt kvasca, 5 g/L tripton, 10 g/L NaCl; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, SAD)

Marker CSL-MDNA-100BPH (Cleaver Scientific, Warwickshire, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Otopina penicilina i streptomicina (10K/10K; Lonza, Basel, Švicarska)

Otopina tripsin-EDTA (0,25%; Sigma-Aldrich St.Louis, Missouri, SAD)

Pufer za denaturaciju PyroMark Denaturation Buffer (Qiagen, Hilden, Njemačka)

Pufer za ispiranje PyroMark Wash Buffer (Qiagen, Hilden, Njemačka)

Puromicin (10 mg/mL; Gibco, Waltham, Massachusetts, SAD)

Sefarozne kuglice obložene streptavidinom Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare, Little Chalfont, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Tris acetatni pufer sa etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) TAE (engl. „*Tris-acetate-EDTA buffer*“; 1 mM Tris; 1 mM octena kiselina; 1 mM EDTA; pH 8,0)

5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid X-Gal (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD)

Plazmidni vektori:

pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro

pN-DNMT3a-ANV/SaCas9/Puro

pN-TET1/SaCas9/Puro

pN-DED1/SaCas9/Puro

Uredaji:

Aspirator (StarLab, Milton Keynes, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

Centrifuga Eppendorf 5430 R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

Grijaća ploča C-MAG HP 4 (IKA, Staufen im Breisgau, Njemačka)

Inkubator Panasonic MCO-230AICUV IncuSafe CO₂ (Panasonic Healthcare, Tokyo, Japan)

Inkubator Shaker G25 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, SAD)

Invertni mikroskop IX73 (Olympus, Tokio, Japan)

Mikrobiološki sigurnosni kabinet MN 090/120 (NÜVE, Ankara, Turska)

Mini centrifuga Combi-Spin FVL-2400N (BioSan, Riga, Latvija)

Pirosekvencer Pyromark Q24 Advanced (Qiagen, Hilden, Njemačka)

Spektrofotometar NanoVue (GE Healthcare, Little Chalfont, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Sustav za dokumentaciju elektroforeze EDAS 290 (Kodak, Rochester, New York, SAD)

Termoblok tresilica Mixer HC (StarLab, Milton Keynes, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Tresilica MS3 digital (IKA, Staufen im Breisgau, Njemačka)

Uređaj za lančanu reakciju polimerazom Veriti 96 Well Thermal Cyclers (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)

Višestruki rotator Multi Bio RS 24 (BioSan, Riga, Latvija)

3.2 Metode

3.2.1 Konstrukcija plazmidnih vektora

3.2.1.1 Kloniranje sekvenci molekula sgRNA u vektore

Za kloniranje molekula sgRNA željenih sekvenci (Tablica 1) korišteni su parovi djelomično komplementarnih oligonukleotida, koji sparivanjem daju dvolančane oligonukleotide s ljepljivim krajevima koji su kompatibilni s krajevima vektora pocijepanih restrikcijskim enzimom BbsI. Sparivanje oligonukleotida napravljeno je miješanjem 1 μL *sense* i *antisense* jednolančanih oligonukleotida (10 mM), 0,5 μL T4 polinukleotid kinaze (PNK), 1 μL T4 DNA ligacijskog pufera te 6,5 μL vode čime je dobivena reakcijska smjesa od 10 μL . Reakcijska smjesa je zatim inkubirana u uređaju Veriti Thermal Cyclor (37 °C 30min, 95 °C 5min, spuštanje 5 °C/min do 25 °C, 25 °C ∞). Dobiveni spareni oligonukleotidi ugrađeni su na željeno mjesto u vektorima pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro, pN-DNMT3a-ANV/SaCas9/Puro, pN-TET1/SaCas9/Puro i pN-DED1/SaCas9/Puro u reakciji ligacije. Prvo su pripremljena razrijeđenja vektora na 100 ng/ μL , i razrijeđenja oligonukleotida molekula sgRNA od 110x za one koje je trebalo ugraditi u konstrukte DNMT3a AKT/ANV te od 120x za konstrukte TET1/DED. Potom su za svaku reakciju pomiješani 1 μL vektora, 1 μL sparenih i fosforiliranih oligonukleotida molekula sgRNA, 2 μL 10x pufera G, 1 μL 10mM DTT, 1 μL 10 mM ATP, 0,5 μL restrikcijskog enzima BbsI (digestija vektora), 0,5 μL T4 DNA ligaze te 13 μL vode čime je dobivena reakcijska smjesa od 20 μL . Reakcijska smjesa je zatim inkubirana u uređaju Veriti Thermal Cyclor ([37 °C 5min, 23 °C 5min]x6, 4 °C ∞). Završno je napravljen tretman egzonukleazom V (RecBCD) kako bi se pocijepale sve linearne molekule DNA dodavanjem 1 μL enzima RecBCD i 1 μL ATP u reakcijsku smjesu. Reakcija je postavljena u uređaj Veriti Thermal Cyclor (37 °C 30min, 4 °C ∞).

Tablica 1. Sekvence molekula sgRNA za navođenje fuzijskih proteina dCas9-DNMT3a i dCas9-TET1 na gene *BACH2*, *LAMB1* i *MGAT3* te nespecifična ("non-targeting", NT) kontrola. Sekvencama označenima sa * dodana je baza gvanin (G) na 5' kraju kako bi se postigla efikasna transkripcija molekule sgRNA s promotora U6.

NAZIV MOLEKULE sgRNA	SEKVENCA MOLEKULE sgRNA
BACH2-F3-18nt	5' -*GATTTTCTAGGAACGGGAA-3'
BACH2-F3-20nt	5' -GCATTTTCTAGGAACGGGAA-3'
BACH2-F3-21nt	5' -GGCATTTTCTAGGAACGGGAA-3'
BACH2-F4-18nt	5' -GTCAACAATGTAGCGATT-3'
BACH2-F4-20nt	5' -*GATGTCAACAATGTAGCGATT-3'
BACH2-F4-21nt	5' -*GAATGTCAACAATGTAGCGATT-3'
LAMB1-F4-18nt	5' -*GTCCGGACACGTCGAAGTG-3'
LAMB1-F4-20nt	5' -GCTCCGGACACGTCGAAGTG-3'
LAMB1-F4-21nt	5' -GGCTCCGGACACGTCGAAGTG-3'
MGAT3-F1-18nt	5' -*GAGCACATTCGCTGGGATA-3'
MGAT3-F1-20nt	5' -GGAGCACATTCGCTGGGATA-3'
MGAT3-F1-21nt	5' -*GTGGAGCACATTCGCTGGGATA-3'
NT-sgRNA-18nt	5' -GGGCGCGCCGCTCTCTAC-3'
NT-sgRNA-20nt	5' -GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC-3'
NT-sgRNA-21nt	5' -GTTAGGCGCGCCGCTCTCTAC-3'

3.2.1.2 Transformacija bakterija metodom toplinskog šoka

Dobivenim ligacijskim smjesama transformirane su kemijski kompetente bakterije soja *E. coli* XL-10 Gold metodom toplinskog šoka (engl. „*heat shock*”). Bakterije su prije korištenja odmrznute (10 min, na ledu). Bitno je da su bakterije na ledu pri svim koracima transformacije osim samog toplinskog šoka.

Za transformaciju je korišteno po 4 µL ligacijske smjese. Nakon dodavanja ligacijske smjese bakterije su inkubirane 13 min na ledu. Temperaturni šok izveden je prijenosom smjese u termostatsku tresilicu Mixer HC na 42 °C, 30 s. Potom je uslijedio oporavak od 2 min na ledu. Zatim je dodano 450 µL medija LB zagrijanog na 37 °C te se proveo oporavak bakterija u termostatskoj tresilici Mixer HC na 37 °C, 40 min, pri 650 rpm.

Nakon oporavka bakterije su nasadene na agarozne ploče. Na svaku agaroznu ploču stavljeno je 50 µL tekućeg medija LB, 50 µL transformiranih bakterija, 50 µL XGal i 40 µL IPTG te su bakterije razmazane po ploči. Napravljena je crveno-bijela selekcija. Vektori u koje se ugradila određena molekula sgRNA izgubili su mRuby3 sekvencu s *lac* operonom te stoga nisu dali crvene kolonije. Ploče su zatim inkubirane preko noći na 37 °C kako bi narasle bakterijske kolonije.

Nakon inkubacije odabrane su po dvije bijele kolonije uspješno transformiranih bakterija. Prekonoćne kulture bakterija postavljene su prebacivanjem kolonija u epruvete s po 5 mL tekućeg medija s ampicilinom (100 µL/mL). Potom su bakterijske kulture inkubirane preko noći na 37 °C pri 350 rpm u termostatskoj tresilici G25 Incubator Shaker.

3.2.1.3 Izolacija rekombinantnih plazmida

Izolacija rekombinantnih plazmida napravljena je iz 5 mL prekonoćnih bakterijskih kultura komercijalnim setom reagensa *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*.

Prekonoćne bakterijske kulture centrifugirane su u centrifugi Eppendorf Centrifuge 5424, 5 min na 10000 g. Supernatant je bačen te su epruvete posušene na papiru. Dodano je 250 µL otopine za resuspenziju stanica (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 100µg/ml RNaze A) (engl. „*Cell Resuspension Solution*“). Bakterije su potpuno resuspendirane na miješalici (engl. „*vortex*“). Dodano je 250 µL otopine za lizu stanica (0,2 M NaOH; 1% SDS) (engl. „*Cell Lysis Solution*“) te su epruvete okretane 4 puta kako bi došlo do miješanja njihovog sadržaja. Izrazito je bitno da se bakterijski lizati ne miješaju na miješalici (engl. „*vortex*“) nakon resuspendiranja kako ne bi došlo do fragmentacije genomske DNA bakterija. Epruvete su inkubirane na sobnoj temperaturi do bistrenja suspenzije. Dodano je 10 µL otopine alkalne

protease (engl. „*Alkaline Protease Solution*“) te su epruvete okretane 4 puta. Inkubacija je trajala do maksimalno 5 minuta zbog mogućeg cijepanja plazmidne DNA. Zatim je dodano 350 μ L otopine za neutralizaciju (4,09 M gvanidijev hidroklorid; 0,759 M kalijev acetat; 2,12 M ledena octena kiselina) (engl. „*Neutralization Solution*“) te je sadržaj promiješan okretanjem epruveta 4 puta. Bakterijski lizat centrifugiran je 10 min na 14000 g pri sobnoj temperaturi.

Za svaki uzorak pripremljena je kromatografska kolona za centrifugiranje s epruvetom za sakupljanje od 2 mL. Bakterijski lizati dekantirani su u kromatografske kolone za centrifugiranje te su centrifugirani 1 min na 14000 g pri sobnoj temperaturi. Filtrat je bačen iz epruveta za sakupljanje. U kromatografske kolone za centrifugiranje dodano je 750 μ L otopine za ispiranje kolone (162,8 mM kalijev acetat; 22,6 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,109 mM EDTA, pH 8,0) (engl. „*Column Wash Solution*“) te su centrifugirane 1 min na 14000 g pri sobnoj temperaturi. Filtrat je bačen iz epruveta za sakupljanje. Ispiranje je ponovljeno s 250 μ L otopine za ispiranje kolone. Kromatografske kolone za centrifugiranje prebačene su u epruvete od 1,5 mL. Plazmidna DNA eluirana je dodavanjem 100 μ L vode bez nukleaza (engl. „*Nuclease-Free Water*“) u kromatografske kolone za centrifugiranje i centrifugiranjem 1 min na 14000 g pri sobnoj temperaturi. Nakon izolacije izmjerena je koncentracija plazmidne DNA na spektrofotometru NanoVue. Plazmidne DNA pohranjene su na -20 °C.

3.2.1.4 Sekvenciranje rekombinantnih plazmida

Rekombinantni plazmidi su poslani servisu Macrogen na sekvenciranje Sangerovom metodom kako bi se potvrdila ispravnost sekvence. Rekombinantni plazmidi su razrijeđeni elucijskim puferom prema uputama na stranici servisa Macrogen (https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/ces_sample_prep.jsp) zajedno s početnicom za sekvenciranje (U6_Fwd početnica: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC-3'). Rezultati sekvenciranja obrađeni su u računalnom programu SnapGene. Nakon sekvenciranja odabrana je po jedna kolonija bakterija od svake transformacije koja sadrži ispravan plazmid.

3.2.2 Održavanje stanica HEK293 u kulturi

Za održavanje stanica HEK293 u staničnoj kulturi korišten je medij DMEM (od engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) s 10% FBS (od engl. *Fetal Bovine Serum*), 1% glutaminom (Gln) te 1% mješavinom antibiotika penicilina i streptomicina (Pen/Strep) koja inhibira rast gram pozitivnih i gram negativnih bakterija. Stanice su inkubirane na 37 °C, 5% CO₂ u inkubatoru Panasonic MCO-230AICUV IncuSafe CO₂.

Rast stanica HEK293 praćen je pod invertnim svjetlosnim mikroskopom Olympus IX73. Kada bi stanice dosegle 90-100% konfluencije presađene su u nove petrijeve zdjelice u omjerima 1:2 ili 1:4, ovisno o tome koji dan je uočena maksimalna konfluencija. Prije presađivanja stanicama je uklonjen medij te su isprane puferom 1xPBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; pH 7,4). Stanice su presađivane tako što su tripsinizirane u otopini tripsin-EDTA (0,25%) 3 min na 37 °C, 5% CO₂. Tripsin je inaktiviran dodatkom medija DMEM (s 10% FBS, 1% Gln i 1% Pen/Strep), stanice su resuspendirane te nasađene u željenom omjeru u novu petrijevu zdjelicu.

3.2.3 Transfekcija stanica HEK293 plazmidnim vektorima

Dva dana prije transfekcije stanice su nasađene iz ≈ 90% konfluentne petrijeve zdjelice (6. presađivanje) na 3 pločice s po 24 bazenčića (*24-well plate*), 40 000 stanica po bazenčiću. Ukupni volumen bio je 500 µL medija DMEM (s 10% FBS, 1% Gln i 1% Pen/Strep) po bazenčiću.

Za transfekciju stanica HEK293 plazmidnim vektorima korišten je komercijalni set reagensa *Lipofectamine*[™] 3000. Stanice su transfecirane sa 100 ng plazmidne DNA po bazenčiću. Transfekcija je rađena u biološkim replikama. Na dan transfekcije pripremljena je matična otopina reagensa Lipofectamine i matična otopina reagensa P300 za ukupno 72 transfekcije (60 transfekcija, 4 negativne probe i 8 dodatnih za gubitke pri pipetiranju). Matična otopina reagensa Lipofectamine napravljena je miješanjem 108 µL reagensa Lipofectamine i 1800 µL medija OptiMEM (za 26,5 µL po bazenčiću). Matična otopina reagensa P300 napravljena je miješanjem 72 µL reagensa P300 i 1800 µL medija OptiMEM (za 26 µL po bazenčiću). Obje matične otopine promiješane su na miješalici (engl. „*vortex*“) te su kratko centrifugirane. Matična otopina reagensa P300 alikvotirana je po 57,2 µL u 30 epruveta označenih brojevima konstrukata i 109,2 µL u epruvetu za negativnu kontrolu. U

epruvete s matičnim otopinama reagensa P3000 dodani su odgovarajući volumeni plazmidnih DNA. U epruvetu za negativnu kontrolu nije dodana DNA.

Sadržaj epruveta je promiješan na miješalici (engl. „*vortex*“) te su epruvete kratko centrifugirane. Zatim je u epruvete s regensom P300 i plazmidnim DNA dodano po 58,3 μ L matične otopine reagensa Lipofectamine, a u epruvetu za negativnu kontrolu 111,3 μ L. Smjese su inkubirane 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije dodano je po 50 μ L odgovarajuće transformacijske smjese u odgovarajuće bazenčiće na pločici s 24 bazenčića. Pločice su zatim inkubirane na 37°C u atmosferi s 5% CO₂.

Prvi dan nakon transfekcije stanice su presađene iz pločica s 24 bazenčića u pločice sa 6 bazenčića. U bazenčiće pločica sa 6 bazenčića dodano je po 1,5 mL medija DMEM (s 10% FBS, 1% Gln i 1% Pen/Strep). Stanicama je uklonjen medij te su isprane s 1 mL 1xPBS. Stanice su presađene tako što su tripsinizirane s 500 μ L otopine tripsin-EDTA (0,25%) 3 min na 37 °C, 5% CO₂. Tripsin je inaktiviran dodatkom 1 mL medija DMEM (s 10% FBS, 1% Gln i 1% Pen/Strep). Potom je po 1,5 mL stanica prebačeno s pločica s 24 bazenčića u odgovarajuće bazenčiće pločica sa 6 bazenčića te su vraćene u inkubator.

Drugi dan nakon transfekcije, 24 h nakon presađivanja, započeta je selekcija puromicinom. Iz matične otopine puromicina koncentracije 10 mg/mL napravljena je radna otopina koncentracije 1 mg/mL u mediju OptiMEM. Dodano je po 4,5 μ L radne otopine u svaki bazenčić s 3 mL medija DMEM (s 10% FBS, 1% Gln i 1% Pen/Strep), čime je dobivena konačna koncentracija od 1,5 μ g/mL u svakom bazenčiću. Selekcija je trajala 48 h.

Selekcija je prekinuta nakon 48 h, četvrti dan nakon transfekcije. Stanice su dva puta isprane s po 3 mL 1xPBS te im je dodano po 3 mL svježeg medija DMEM (s 10% FBS, 1% Gln i 1% Pen/Strep).

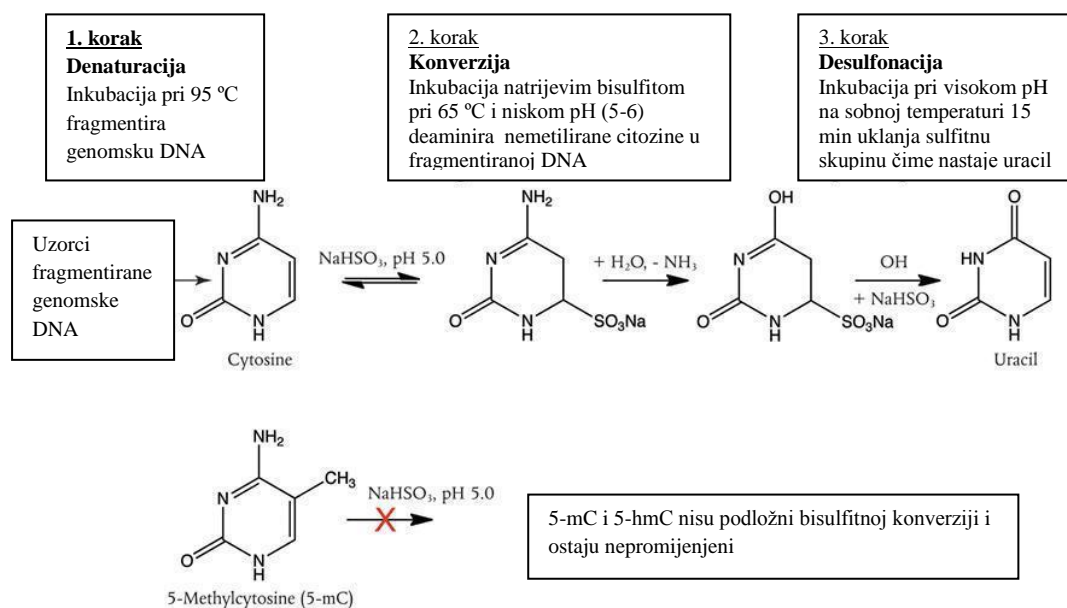
Stanicama je uklonjen medij aspiratorom te su isprane s po 2 mL 1xPBS po bazenčiću. Zatim su tripsinizirane dodavanjem po 500 μ L otopine tripsin-EDTA (0,25%) u svaki bazenčić te su inkubirane 3 min na 37 °C, 5% CO₂. Tripsin je inaktiviran dodatkom 700 μ L medija DMEM (s 10% FBS, 1% Gln i 1% Pen/Strep), stanice su dobro resuspendirane te su prebačene u epruvete za smrzavanje. Epruvete za smrzavanje su zatim centrifugirane u centrifugi Eppendorf Centrifuge 5430 R 5 min na 1000 g, nakon čega je uklonjen supernatant. Talog stanica je resuspendiran u 200 μ L 1xPBS-a te su resuspendirane stanice centrifugirane 5 min na 1000 g. Uklonjen je supernatant te su stanice podvrgnute procesu trenutnog zamrzavanja uranjanjem u tekući dušik. Uzorci su pohranjeni na -80 °C do daljnje obrade.

3.2.4 Izolacija genomske DNA iz transfeciranih stanica HEK293

Za izolaciju ukupne genomske DNA korišteni su digestijski pufer i proteinaza K. Svakom uzorku dodano je po 50 μL digestijskog pufera i po 1 μL proteinaze K, a negativnim kontrolama je dodano po 200 μL digestijskog pufera i 4 μL proteinaze K zbog veće količine taloga stanica. Reakcijske smjese inkubirane su preko noći na 37 °C na 300 rpm. Nakon inkubacije proteinaza K je inaktivirana inkubacijom 8 min na 95 °C te su uzorci pohranjeni na -4 °C do daljnje obrade.

3.2.5 Bisulfitna konverzija izolirane genomske DNA

Bisulfitna konverzija izolirane genomske DNA napravljena je komercijalnim setom reagensa *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* prema uputama proizvođača. Metilirana DNA se tretira s bisulfitom koji deaminira nemetilirane citozine. Desulfonacijom se deaminirani citozin prevodi u uracil. Metilirani citozini ostaju nepromijenjeni tokom tretmana (Slika 5).



Slika 5. Bisulfitna konverzija nemetiliranih citozina. Konverzija se odvija u tri koraka. U prvom koraku se DNA denaturira pri 95 °C. Zatim se odvija konverzija inkubacijom s natrijevim bisulfitom pri 65 °C i niskom pH (5-6) pri čemu se deaminiraju nemetilirani citozini. U zadnjem koraku se odvija desulfonacija inkubacijom pri visokom pH na sobnoj temperaturi na 15 min čime nastaje uracil. Metilirani citozini (5-mC) i hidroksimetilirani citozini (5-hmC) ostaju nepromijenjeni (Preuzeto s <https://www.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion#tabselect4>).

Prvo je pripremljen konverzijski reagens CT dodavanjem 900 μL vode, 300 μL pufera za razrijeđivanje (engl. „*M-Dilution Buffer*“, proizvođač ne navodi sastav) i 50 μL pufera za resuspenziju (engl. „*M-Dissolving Buffer*“, proizvođač ne navodi sastav) u epruveti CT konverzijskog reagensa. Zatim je sadržaj epruvete promiješan (engl. „*vortex*“) nakon čega su epruvete okretane 10 min na višestrukum rotatoru Multi Bio RS 24. U epruvete za PCR dodano je po 20 μL uzoraka DNA i 130 μL konverzijskog reagensa. Potom je sadržaj u epruvatama za PCR promiješan te je kratko centrifugiran mini centrifugom Combi-Spin FVL-2400N. Epruvete za PCR su potom inkubirane u uređaju Veriti Thermal Cycler (98°C 10 min, 64°C 2,5 h, 4°C do 20 h).

Zatim je u kromatografske kolone za centrifugiranje stavljeno po 600 μL pufera za vezanje (engl. „*M-Binding Buffer*“, proizvođač ne navodi sastav) koji veže DNA te su dodani uzorci iz epruveta za PCR. Kromatografske kolone su zatvorene te je sadržaj promiješan okretanjem. Potom su kromatografske kolone centrifugirane u Eppendorf 5424 centrifugi pri 14 000 g, 30 s. Filtrat je bačen te je na kromatografske kolone stavljeno po 100 μL pufera za ispiranje (engl. „*M-Wash Buffer*“, proizvođač ne navodi sastav). Nakon centrifugiranja u kromatografske kolone je dodano po 200 μL desulfonacijskog pufera (engl. „*M-Desulphonation Buffer*“, proizvođač ne navodi sastav) te su uzorci inkubirani 20 min pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije kromatografske kolone su centrifugirane te su napravljena još dva ispiranja s po 200 μL pufera za ispiranje. Filtrat je bačen. Kromatografske kolone su potom prebačene u epruvete od 1,5 mL te je dodano po 10 μL elucijskog pufera (engl. „*M-Elution Buffer*“, proizvođač ne navodi sastav) direktno u sredinu kromatografske kolone. Završnim centrifugiranjem eluirano je po 10 μL bisulfitno konvertirane DNA s kromatografske kolone u epruvete od 1,5 mL te je spremljena na -20 °C do daljnjeg korištenja.

3.2.6 Lančana reakcija polimerazom DNA nakon bisulfitne konverzije

Željeni fragmenti DNA nakon bisulfitne konverzije umnoženi su postupkom lančane reakcije polimerazom (PCR) komercijalnim setom reagensa *PyroMark PCR Kit*. Reakcijska smjesa za PCR pripremljena je dodavanjem 1 μL uzorka u smjesu 12,5 μL na miješalici (engl. „*vortex*“) 2x matične otopine *PyroMark PCR*, 2,5 μL koncentrata *CoraLoad*, 0,5 μL 10 μM *Forward* početnica, 0,5 μL 10 μM biotiniliranih *Reverse* početnica te 8 μL vode. Za svaki gen korišten je zaseban par početnica (Tablica 2). Za negativnu kontrolu bisulfitne konverzije stavljen je 1 μL destilirane vode umjesto uzorka u reakcijsku smjesu. Reakcijske smjese su inkubirane u

uređaju Veriti Thermal Cycler (95 °C 15 min, [94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30s]x45, 72 °C 10 min, 4 °C ∞).

Tablica 2. Sekvence početnica za umnažanje DNA nakon bisulfitne konverzije. Reverzne početnice imaju na sebi kovalentno vezan biotin ([BTN]) kako bi se produkti nastali lančanom reakcijom polimeraze mogli vezati za streptavidin na sefarnim kuglicama za pirosekvenciranje.

Naziv početnice	Sekvenca početnice
BACH2Fw3	5'-GTTTTTATGGTATTTTTTAGG-3'
BACH2Rev3	5'-[Btn]TCCCTCTACTATTCCAAAA-3'
BACH2_Fw4	5'-TTATTGTGAATGGGGA-3'
BACH2_Rev4_Biot	5'-[Btn]ACTACTACTACTAAAAC-3'
LAMB1-F4:	5'-GAAGTGGAGGGTTTAT-3'
LAMB1-R4_Btn	5'-[Btn]ATCAAATCTATCCAACAA-3'
MGAT3_ Fw1_450K	5'-GTTGGGATATAGAATAGGTAG-3'
MGAT3_ Rev1_450K	5'-[Btn]ACCATTCTCTCAAACTCA-3'

3.2.7 Pirosekvenciranje

Umnoženi fragmenti DNA nakon bisulfitne konverzije pirosekvencirani su na uređaju za pirosekvenciranje Pyromark Q24 Advanced. Protokoli za pirosekvenciranje za svaki gen napravljeni su u računalnom programu PyroMark Q24 Advanced Software te su prebačeni u uređaj za pirosekvenciranje.

Uređaj za pirosekvenciranje je upaljen 30 min prije početka rada. Također je pripremljena radna postaja (engl. "*Workstation*") dodavanjem 70%-tnog etanola, denaturacijske otopine (engl. „*Denaturation Buffer*“, proizvođač ne navodi sastav), pufera za ispiranje (engl. „*Wash Buffer*“, proizvođač ne navodi sastav) te destilirane vode u odgovarajuće posudice. Po potrebi su pripremljeni smjesa enzima (DNA polimeraza, ATP

sulfurilaza, luciferaza i apiraza) i smjesa supstrata (adenozin 5' fosfosulfat i luciferin) dodavanjem 660 μ L deionizirane vode u ampulu s liofiliziranom smjesom enzima i ampulu s liofiliziranom smjesom supstrata. Nakon dodavanja ampule su lagano promiješane.

Za svaki test rađena je matična otopina sefaroze miješanjem 962 μ L pufera za vezanje (engl. „*Binding Buffer*“, proizvođač ne navodi sastav), 78 μ L sefaroze i 520 μ L destilirane vode (za 24 uzorka i 2 dodatna za gubitke pri pipetiranju, ukupno 26). Nakon toga je u 20 μ L svakog biotiliniranog PCR produkta dodano po 60 μ L matične otopine sefaroze te je reakcijska smjesa stavljena na tresilicu MS3 digital na 10 min. Zatim je napravljena matična otopina početnica miješanjem 500,5 μ L pufera za renaturaciju (engl. „*Annealing Buffer*“, proizvođač ne navodi sastav) i 19,5 μ L 10 μ M odgovarajuće početnice za pirosekvenciranje (za 24 uzorka i 2 dodatna za gubitke pri pipetiranju, ukupno 26) (Tablica 3). Zatim je dodano po 20 μ L matične otopine početnica u svaku jažicu pločice za pirosekvenciranje te je pločica stavljena na radnu postaju.

Potom je napunjen spremnik za pirosekvenciranje (engl. "*Cartridge*") dodavanjem odgovarajućeg volumena enzima, supstrata i nukleotida, ovisno o tome koji je test rađen. Spremnik za pirosekvenciranje je zatim stavljen u uređaj.

Nakon 10 min na tresilici fragmenti DNA vezali su se na streptavidin na sefaroznim kuglicama te je pločica prebačena na radnu postaju. U pločicu su uronjene iglice vakuum sisaljke. Nakon što je uklonjena sva tekućina, iglice na kojima je vezana sefaroza su uronjene u etanol na 5 s, u denaturacijsku otopinu na 5 s te u pufer za ispiranje na 10 s. Zatim je ugašen vakuum te su iglice spuštene u pločicu za pirosekvenciranje s matičnom otopinom početnica. Laganim treskanjem od 2 min sefaroza s iglica prebačena je u pločicu za pirosekvenciranje koja je potom stavljena na grijaću ploču C-MAG4 2 min na 80 °C. Nakon zagrijavanja pločica za pirosekvenciranje je stavljena u uređaj za pirosekvenciranje te je pokrenut odgovarajući program za pirosekvenciranje.

Tablica 3. Sekvence početnica za pirosekvenciranje.

Naziv početnice	Sekvenca početnice
BACH2_Fw3 (BACH2-SEQ4)	5'-ATGGTATTTTTTAGG-3'
BACH2_Fw4 (BACH2_F4_v2)	5'-GATTGAGAGTGTGGG-3'
LAMB1-F4_seq	5'-TTGATTAGGGTGGG-3'
MGAT3-Fw1_450K	5'-GTTGGGATATAGAATAGGTAG-3'

3.2.8. Statistička obrada podataka

Rezultati pirosekvenciranja obrađeni su nezavisnim parametrijskim t-testom, nezavisnim parametrijskim Welchovim testom i nezavisnim neparametrijskim Wilcoxonovim testom u računalnom programu RStudio, kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika u razinama metilacije ciljanih gena u stanicama HEK293 transfeciranim konstruktima sa sgRNA od 21 nt u odnosu na konstrukte sa sgRNA od 20 nt i 18 nt.

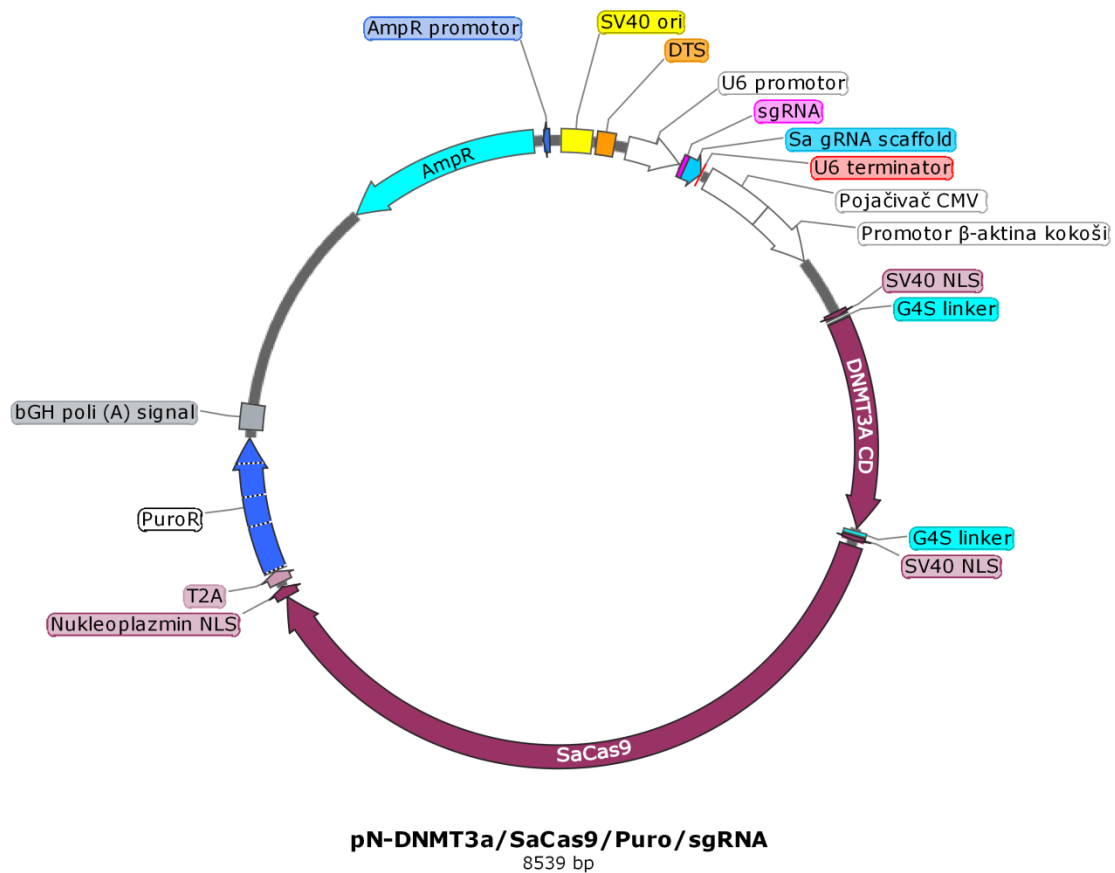
4. REZULTATI

4.1 Konstrukcija rekombinantnih plazmida

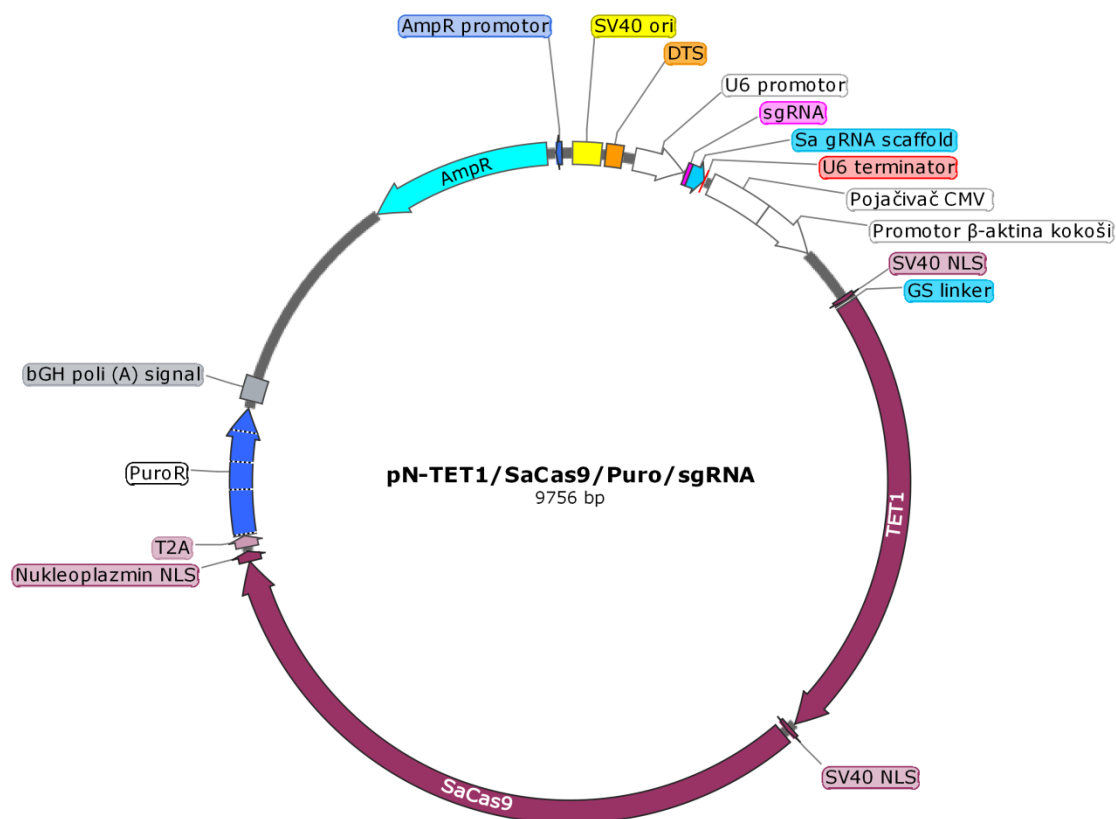
Cilj ovog istraživanja je bila konstrukcija plazmidnih vektora za ciljanu metilaciju i demetilaciju gena koristeći sustav CRISPR/Cas9 za navođenje enzima na ciljne sekvence genoma. Za konstrukciju rekombinantnih plazmida klonirane su molekule sgRNA željenih sekvenci u vektore koji kodiraju za fuzijske konstrukte. Kloniranjem je uklonjena sekvenca iz vektora koja kodira za crveni fluorescentni protein mRuby3. Vektori u koje se nije ugradila određena molekula sgRNA nisu izgubili mRuby3 sekvencu s *lac* operonom i stoga su dali bakterijske kolonije crvene boje, a oni u koje se ugradila izgubili su sekvencu mRuby3 te su dali kolonije bijele boje. Odabrane su po dvije bijele kolonije za svaku ugrađenu molekulu sgRNA u ciljani vektor. Te kolonije su postavljene u prekonoćne bakterijske kulture. Rekombinantni plazmidi su izolirani i izmjerena im je koncentracija. Molekule sgRNA klonirane su u četiri različita vektora: pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro (Slika 6), pN-DNMT3a-ANV/SaCas9/Puro; pN-TET1/SaCas9/Puro (Slika 7) i pN-DED1/SaCas9/Puro. U vektore koji kodiraju za fuzijski konstrukt s DNMT3A klonirane su sgRNA koje ciljaju dva fragmenta gena *BACH2*, a u vektore koji kodiraju s TET1 klonirane su one koje ciljaju gene *LAMB1* i *MGAT3*. Za određivanje nespecifične aktivnosti korištene su molekule sgRNA koje nemaju ciljnu sekvencu u ljudskom genomu (NT, "*non-targeting*"). Takve su sgRNA klonirane u vektore koji kodiraju za fuzijske konstrukte DNMT3A i TET1 s aktivnim katalitičkim domenama (Tablica 4).

Tablica 4. Konstruirani rekombinantni plazmidi

Broj	Plazmidna DNA
1	pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro/BACH2-F4-21nt
2	pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro/BACH2-F4-20nt
3	pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro/BACH2-F4-18nt
4	pN-DNMT3a-ANV/SaCas9/Puro/BACH2-F4-21nt
5	pN-DNMT3a-ANV/SaCas9/Puro/BACH2-F4-20nt
6	pN-DNMT3a-ANV/SaCas9/Puro/BACH2-F4-18nt
7	pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro/BACH2-F3-21nt
8	pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro/BACH2-F3-20nt
9	pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro/BACH2-F3-18nt
10	pN-DNMT3a-ANV/SaCas9/Puro/BACH2-F3-21nt
11	pN-DNMT3a-ANV/SaCas9/Puro/BACH2-F3-20nt
12	pN-DNMT3a-ANV/SaCas9/Puro/BACH2-F3-18nt
13	pN-TET1/SaCas9/Puro/MGAT3-A1-21nt
14	pN-TET1/SaCas9/Puro/MGAT3-A1-20nt
15	pN-TET1/SaCas9/Puro/MGAT3-A1-18nt
16	pN-DED1/SaCas9/Puro/MGAT3-A1-21nt
17	pN-DED1/SaCas9/Puro/MGAT3-A1-20nt
18	pN-DED1/SaCas9/Puro/MGAT3-A1-18nt
19	pN-TET1/SaCas9/Puro/LAMB1-F4-21nt
20	pN-TET1/SaCas9/Puro/LAMB1-F4-20nt
21	pN-TET1/SaCas9/Puro/LAMB1-F4-18nt
22	pN-DED1/SaCas9/Puro/LAMB1-F4-21nt
23	pN-DED1/SaCas9/Puro/LAMB1-F4-20nt
24	pN-DED1/SaCas9/Puro/LAMB1-F4-18nt
25	pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro/NT-21nt
26	pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro/NT-20nt
27	pN-DNMT3a-AKT/SaCas9/Puro/NT-18nt
28	pN-TET1/SaCas9/Puro/NT-sgRNA-21nt
29	pN-TET1/SaCas9/Puro/NT-sgRNA-20nt
30	pN-TET1/SaCas9/Puro/NT-sgRNA-18nt

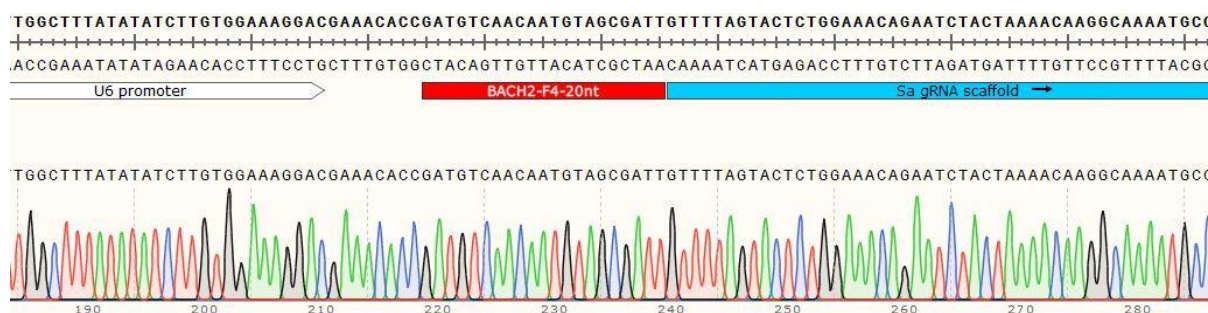


Slika 6. Struktura vektora pN-DNMT3a/SaCas9/Puro u kojega su klonirane molekule sgRNA. **DTS:** sekvenca koja potiče unos plazmida u jezgru, **Promotor U6:** promotor RNA polimeraze III za U6 snRNA čovjeka, **sgRNA:** molekula za navođenje fuzijskog konstrukta (engl. *single guide RNA*), **Sa gRNA scaffold:** sekvenca potrebna za vezanje sgRNA za protein Cas9 bakterije *S. aureus*, **G4S linker:** pentapeptid Gly4Ser, **SV40 NLS:** jezgrin lokalizacijski signal velikog T antigena virusa SV40 (engl. *Simian virus 40*), **DNMT3A CD:** katalitička domena ljudske de novo DNA metiltransferaze 3A, **SaCas9:** katalitički inaktivirana nukleaza iz bakterije *S. aureus*, **Nukleoplazmin NLS:** bipartitni jezgrin lokalizacijski signal iz nukleoplazmina, **T2A:** samocijepajući peptid 2A iz virusa *Thosea asigna*, **PuroR:** N-acetiltransferaza puromicina, **bGH poli (A) signal:** poliadenilacijski signal gena za goveđi hormon rasta, **AmpR:** ekspresijska kazeta za β-laktamazu (rezistencija na ampicilin) (Napravljeno u računalnom programu *SnapGene*)



Slika 7. Struktura vektora pN-TET1/SaCas9/Puro u kojega su klonirane molekule sgRNA. DTS: sekvenca koja potiče unos plazmida u jezgru, **Promotor U6**: promotor RNA polimeraze III za U6 snRNA čovjeka, **sgRNA**: molekula za navođenje fuzijskog konstrukta (engl. *single guide RNA*), **Sa gRNA scaffold**: sekvenca potrebna za vezanje sgRNA za protein Cas9 bakterije *S. aureus*, **GS linker**: pentapeptid Gly4Ser, **SV40 NLS**: jezgrin lokalizacijski signal velikog T antigena virusa SV40 (engl. *Simian virus 40*), **TET1**: katalitička domena ljudske dioksigenaze metilcitozina TET1 (engl. *Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*), **SaCas9**: katalitički inaktivirana nukleaza iz bakterije *S. aureus*, **Nukleoplazmin NLS**: bipartitni jezgrin lokalizacijski signal iz nukleoplazmina, **T2A**: samocijepajući peptid 2A iz virusa *Thosea asigna*, **PuroR**: N-acetiltransferaza puromicina, **bGH poli (A) signal**: poliadenilacijski signal gena za goveđi hormon rasta, **AmpR**: ekspresijska kazeta za β-laktamazu (rezistencija na ampicilin) (Napravljeno u računalnom programu SnapGene)

Plazmidni vektori s ugrađenim molekulama sgRNA poslani su na sekvenciranje. Ukupno je sekvencirano 40 konstrukata. Sekvence plazmidnih DNA dobivene sekvenciranjem Sangerovom metodom uspoređene su sa sekvencama rekombinantnih plazmida s kloniranim sekvencama molekula sgRNA (Slika 8). Utvrđeno je da su molekule sgRNA ispravno klonirane u plazmidne vektore te da prilikom kloniranja nisu nastale neželjene mutacije.



Slika 8. Primjer poravnavanja sekvence rekombinantnog plazmida s kloniranom sgRNA i sekvence dobivene sekvenciranjem Sangerovom metodom. Slika prikazuje ispravno kloniranu sgRNA od 20 nukleotida koja je komplementarna fragmentu F4 gena *BACH2*. Gornji red prikazuje sekvencu rekombinantnog plazmida s kloniranom sgRNA, a donji red prikazuje sekvencu dobivenu sekvenciranjem Sangerovom metodom. Promatranjem rezolucije i oštrote šiljaka (engl. *peaks*) ispod svakog pojedinačnog nukleotida određuje se kvaliteta očitavanja sekvence. Što je šiljak oštrije i razdvojeniji od susjednih šiljaka, to je kvalitetnije očitavanje nukleotida. U ovom primjeru vidljiva je visoka kvaliteta očitavanja nukleotidne sekvence.

4.2 Transfekcija stanica HEK293 i izolacija genomske DNA

Stanice HEK293 transfecirane su sa plazmidnim konstruktima i selektirane antibiotikom puromicinom. Stanice koje nisu primile plazmidni konstrukt su uginule te su uklonjene, a one koje su primile plazmidni konstrukt su se oporavile te im je dodan svježi medij. Kontrolne replike stanica („Mock“) tretirane su transfekcijskim reagensom bez dodavanja plazmidne DNA. Nakon selekcije i oporavka stanice su centrifugirane, uklonjen je supernatant te su zamrznute uranjanjem u tekući dušik. Genomska DNA uspješno je izolirana iz staničnih taloga.

4.3 Pirosekvenciranje

Razine metilacije CpG mjesta fragmenata gena *BACH2*, *LAMB1* i *MGAT3* ciljanih fuzijskim konstruktima za promjenu metilacije određene su metodom pirosekvenciranja radi uspoređivanja utjecaja molekula sgRNA različitih duljina na učinkovitosti i specifičnost fuzijskih konstrukata. Testovi za svaki bisulfitno konvertirani fragment rađeni su u duplikatima. Za utvrđivanje utjecaja duljine molekule sgRNA na učinkovitost metilacije/demetilacije DNA uspoređene su srednje vrijednosti metilacije fragmenata ciljanih s molekulama sgRNA duljine 21 nukleotida sa sgRNA od 20 i 18 nukleotida. Za utvrđivanje utjecaja duljine molekule sgRNA na nespecifičnu aktivnost uspoređene su srednje vrijednosti metilacije fragmenata gdje su konstrukti imali molekule sgRNA bez ciljne sekvence u genomu duljine od 21 nukleotida s onima koji su imali sgRNA duljine od 20 i 18 nukleotida. Statistička značajnost određena je t-testom. Rezultati čija je p-vrijednost manja od 0,05 smatrani su statistički značajnima.

Usporedbom razine srednjih vrijednosti metilacije CpG mjesta stanica transfeciranih bez dodavanja plazmidne DNA („Mock“) s razinama srednjih vrijednosti metilacije CpG mjesta transfeciranih stanica utvrđene su statistički značajne promjene korištenjem svih fuzijskih konstrukata čije su sgRNA imale ciljne sekvence u genomu. Kod fuzijskih konstrukata čije sgRNA nisu imale ciljne sekvence u genomu („*non-targeting*“) u odnosu na stanice transfecirane bez dodavanja plazmidne DNA utvrđene su statistički značajne promjene u srednjim vrijednostima metilacije, osim kod fragmenta A1 gena *MGAT3* (Tablica 5).

Tablica 5. Statistička značajnost razlika u metilaciji dobivena usporedbom srednjih vrijednosti metilacije CpG mjesta u stanicama transfeciranim s plazmidnim vektorima i stanicama transfeciranim bez plazmidnih vektora („Mock“) t-testom. P-vrijednosti manje od 0,05 smatraju se statistički značajnima (zeleno). P-vrijednosti označene sa * dobivene su nezavisnim Wilcoxonovim testom, dok su p-vrijednosti označene sa ** dobivene nezavisnim Welchovim t-testom.

Uspoređivane biološke skupine	p-vrijednost
LAMB1-21nt i "Mock"	0.0004291**
LAMB1-20nt i "Mock"	0.0008507**
LAMB1-18nt i "Mock"	0.001523**
LAMB1-NT-21nt i "Mock"	0.004917**
LAMB1-NT-20nt i "Mock"	0.004064**
LAMB1-NT-18nt i "Mock"	0.004927**
MGAT3-21nt i "Mock"	0.01482**
MGAT3-20nt i "Mock"	0.008001**
MGAT3-18nt i "Mock"	0.02156**
MGAT3-NT-21nt i "Mock"	0.2358
MGAT3-NT-20nt i "Mock"	0.3105
MGAT3-NT-18nt i "Mock"	0.2848
BACH2-F3-21nt i "Mock"	2.04379e-05*
BACH2-F3-20nt i "Mock"	2.03712e-05*
BACH2-F3-18nt i "Mock"	2.03712e-05*
BACH2-F3-NT-21nt i "Mock"	0.00470154*
BACH2-F3-NT-20nt i "Mock"	0.00871546*
BACH2-F3-NT-18nt i "Mock"	0.00646776*
BACH2-F4-21nt i "Mock"	0.00102068*
BACH2-F4-20nt i "Mock"	0.000852234*
BACH2-F4-18nt i "Mock"	0.000852234*
BACH2-F4-NT-21nt i "Mock"	0.0185655*
BACH2-F4-NT-20nt i "Mock"	0.0324764*
BACH2-F4-NT-18nt i "Mock"	0.00937772*

Kod fragmenta F4 gena *LAMB1* nije utvrđena statistički značajna promjena razine demetilacije korištenjem sgRNA od 20 nt i 18 nt u odnosu na sgRNA od 21 nt (Slika 9). Kod nespecifične kontrole nije utvrđena statistički značajna promjena razine demetilacije korištenjem sgRNA od 20 nt i 18 nt u odnosu na sgRNA od 21 nt (Slika 10) (Tablica 6).

Analizom statusa metilacije fragmenta A1 gena *MGAT3* nije utvrđena statistički značajna promjena u razini demetilacije korištenjem sgRNA od 20 nt i 18 nt u odnosu na

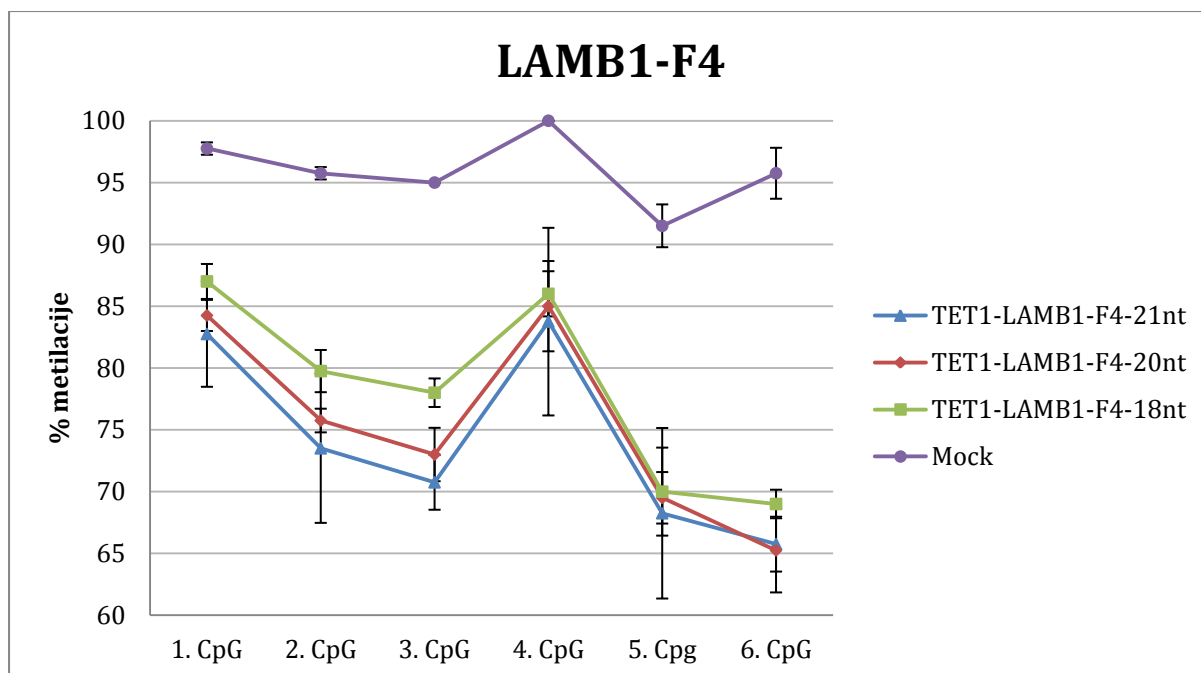
sgRNA od 21 nt (Slika 11). Kod nespecifičnih kontrola nisu utvrđene statistički značajne promjene u razini metilacije (Slika 12) (Tablica 6).

Za fragment F3 gena *BACH2* nije utvrđena statistički značajna promjena razine metilacije korištenjem sgRNA od 20nt i 18 nt u odnosu na sgRNA od 21 nt (Slika 13). Kod nespecifičnih kontrola nisu utvrđene statistički značajne promjene u razini metilacije (Slika 14) (Tablica 6).

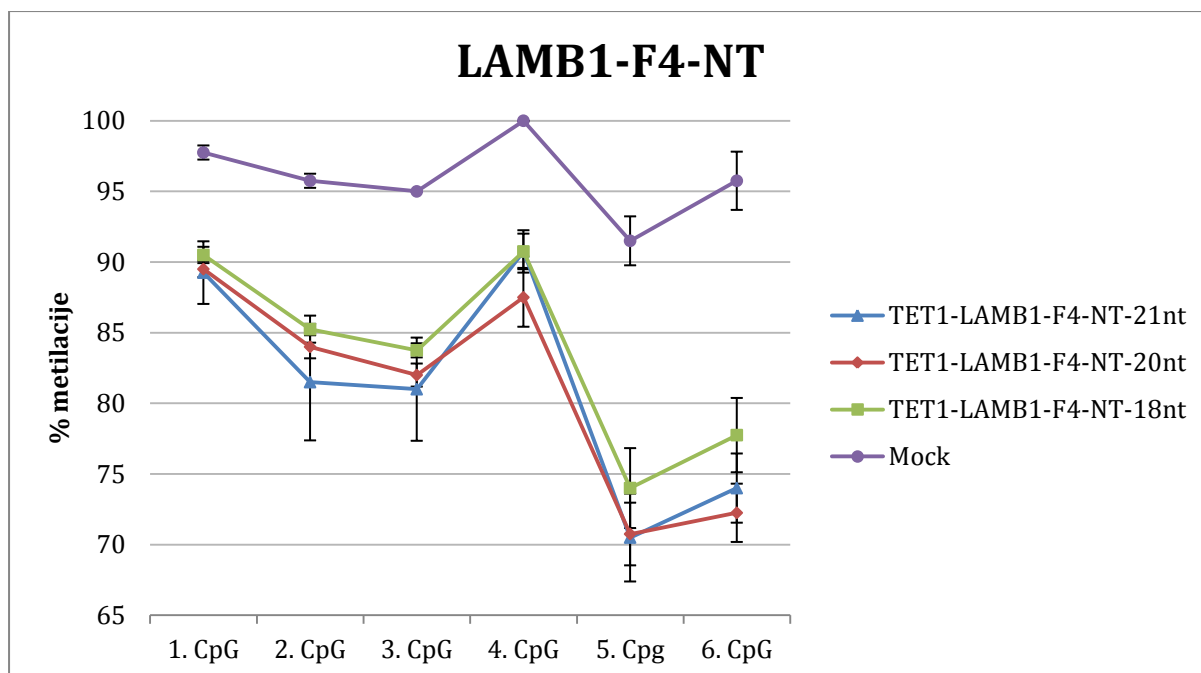
Za fragment F4 gena *BACH2* nije utvrđena statistički značajna promjena u razini metilacije korištenjem sgRNA od 20 nt i 18 nt u odnosu na sgRNA od 21 nt (Slika 15). Kod nespecifičnih kontrola nisu utvrđene statistički značajne promjene u razini metilacije (Slika 16) (Tablica 6).

Tablica 6. Statistička značajnost razlika u metilaciji dobivenih usporedbom srednjih vrijednosti metilacije CpG mjesta u stanicama transfeciranih s fuzijskim konstruktima s različitom duljinom molekula sgRNA nezavisnim t-testom i nezavisnim Wilcoxonovim testom. P-vrijednosti manje od 0,05 se smatraju statistički značajnima. P-vrijednosti označene sa * dobivene su nezavisnim Wilcoxonovim testom.

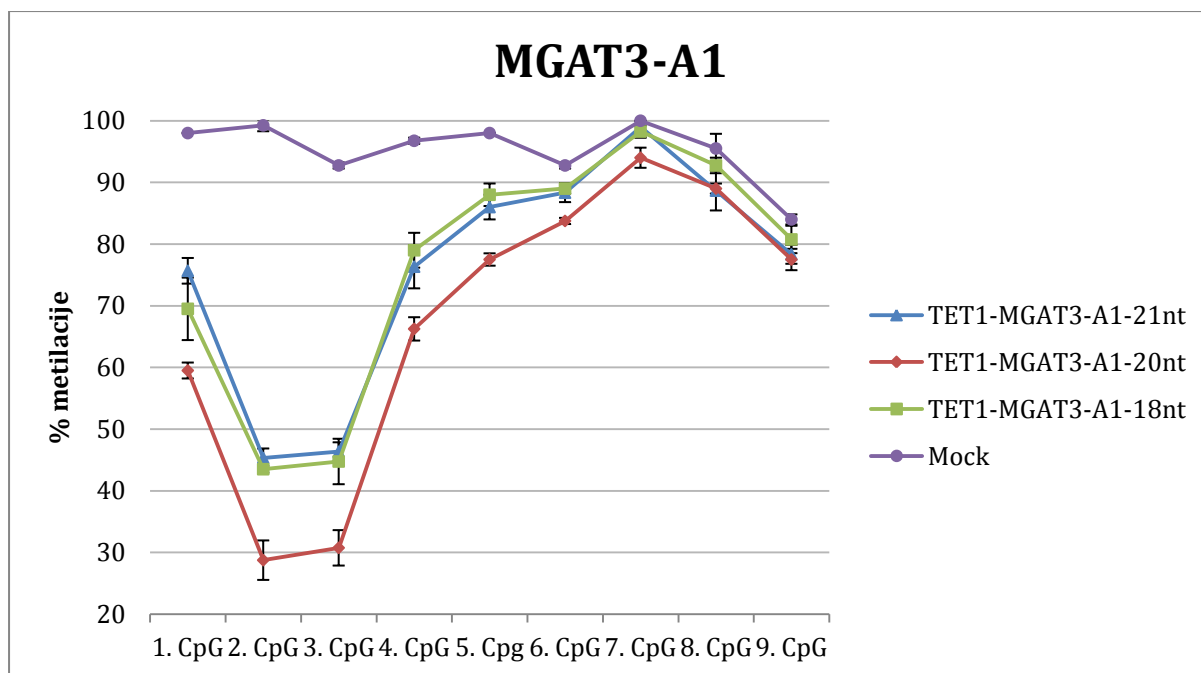
Uspoređivane biološke skupine	p-vrijednosti
LAMB1-21nt i LAMB1-20nt	0,7713
LAMB1-21nt i LAMB1-18nt	0,3641
LAMB1-NT-21nt i LAMB1-NT-20-nt	0,9717
LAMB1-NT-21nt i LAMB1-NT-18nt	0,5723
MGAT3-21nt i MGAT3-20nt	0,4085
MGAT3-21nt i MGAT3-18nt	0,9856
MGAT3-NT-21nt i MGAT3-NT-20nt	0,8997
MGAT3-NT-21nt i MGAT3-NT-18nt	0,9734
BACH2-F3-21nt i BACH2-F3-20nt	0,5728
BACH2-F3-21nt i BACH2-F3-18nt	0,6779
BACH2-F3-NT-21nt i BACH2-F3-NT-20nt	0,876232*
BACH2-F3-NT-21nt i BACH2-F3-NT-18nt	0,738408*
BACH2-F4-21nt i BACH2-F4-20nt	0,2792
BACH2-F4-21nt i BACH2-F4-18nt	0,253
BACH2-F4-NT-21nt i BACH2-F4-NT-20nt	1
BACH2-F4-NT-21nt i BACH2-F4-NT-18nt	0,6899



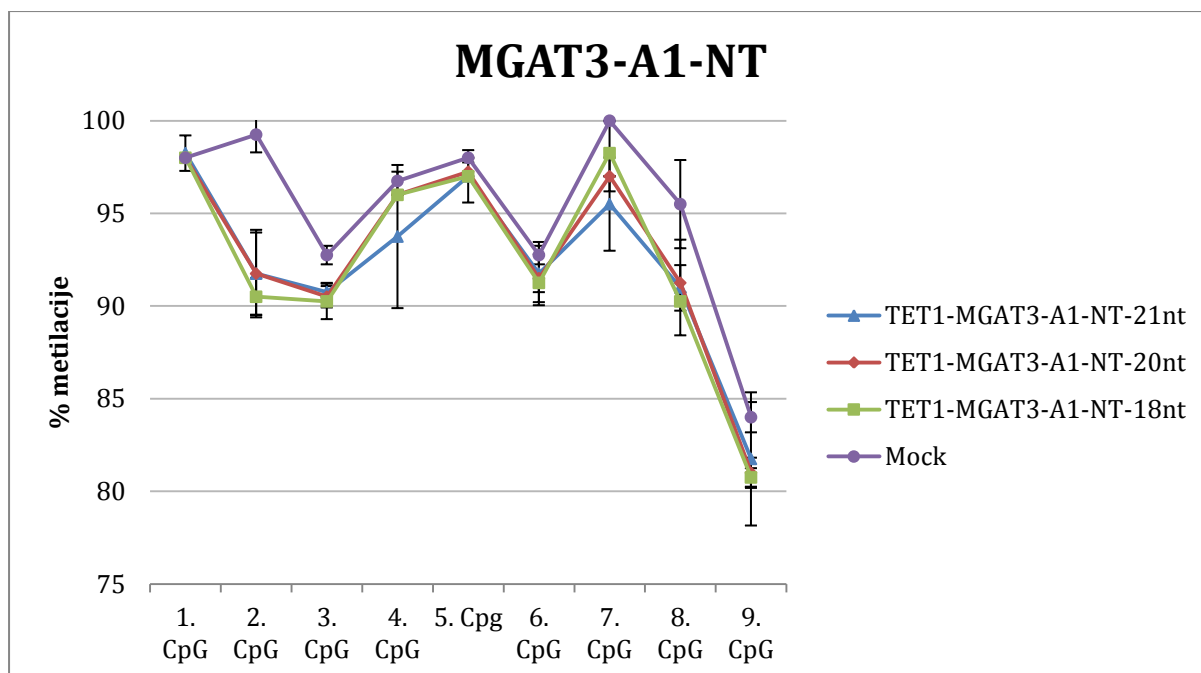
Slika 9. Srednje vrijednosti metilacije CpG mjesta fragmenta F4 gena *LAMB1* stanica HEK293 transfeciranih plazmidnim vektorom koji kodira za fuzijski konstrukt dCas9-TET1 za demetilaciju sa sgRNA od 21, 20 i 18 nukleotida. „Mock“ prikazuje srednje vrijednosti metilacije fragmenta F4 gena *LAMB1* stanica HEK293 transfeciranih bez plazmidne DNA. Raspon pogreške (engl. „error bar“) prikazuje standardnu devijaciju.



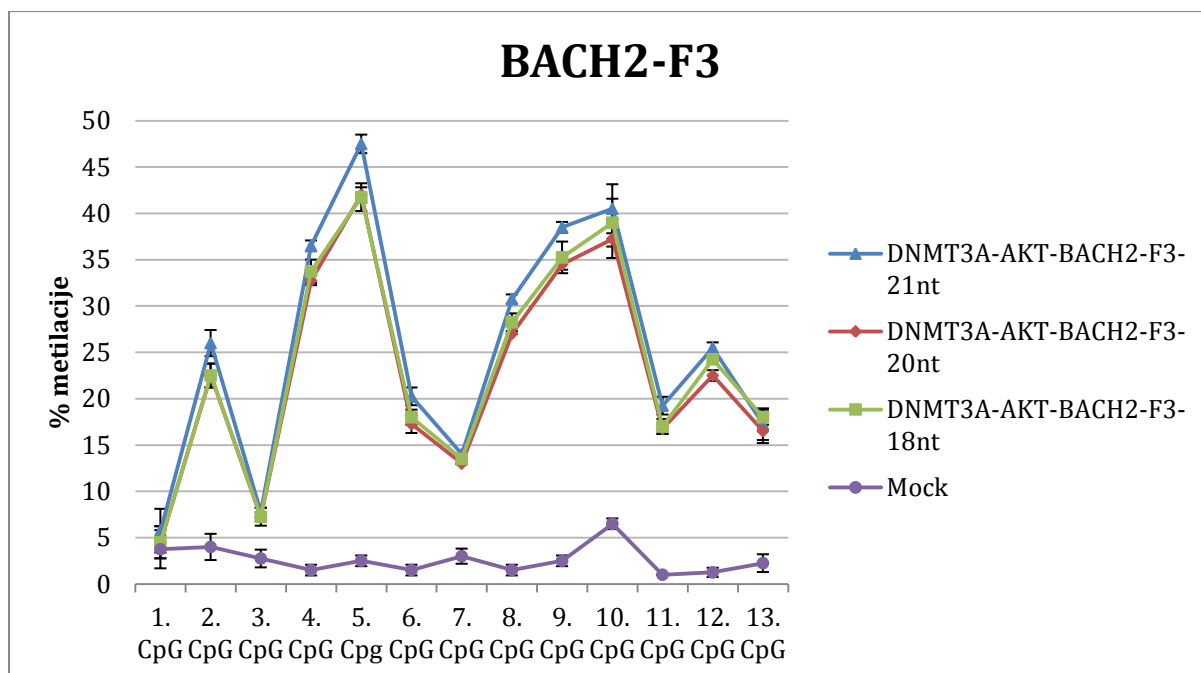
Slika 10. Srednje vrijednosti metilacije CpG mjesta fragmenta F4 gena *LAMB1* stanica HEK293 transfeciranih plazmidnim vektorom koji kodira za fuzijski konstrukt dCas9-TET1 za demetilaciju gdje su konstrukti imali nespecifičnu sgRNA dugačku 21, 20 i 18 nukleotida. „Mock“ prikazuje srednje vrijednosti metilacije fragmenta F4 gena *LAMB1* stanica HEK293 transfeciranih bez plazmidne DNA. Raspon pogreške (engl. „error bar“) prikazuje standardnu devijaciju.



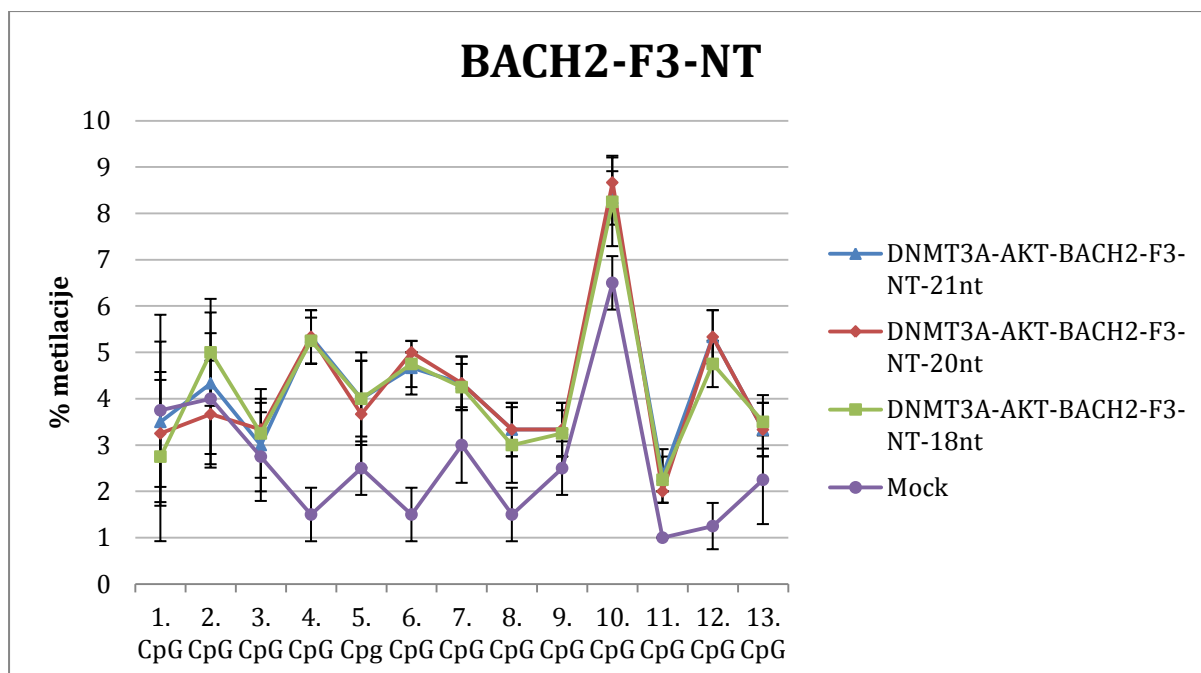
Slika 11. Srednje vrijednosti metilacije CpG mjesta fragmenta A1 gena *MGAT3* stanica HEK293 transfeciranih plazmidnim vektorom koji kodira za fuzijski konstrukt dCas9-TET1 za demetilaciju sa sgRNA od 21, 20 i 18 nukleotida. „Mock“ prikazuje srednje vrijednosti metilacije fragmenta A1 gena *MGAT3* stanica HEK293 transfeciranih bez plazmidne DNA. Raspon pogreške (engl. „error bar“) prikazuje standardnu devijaciju.



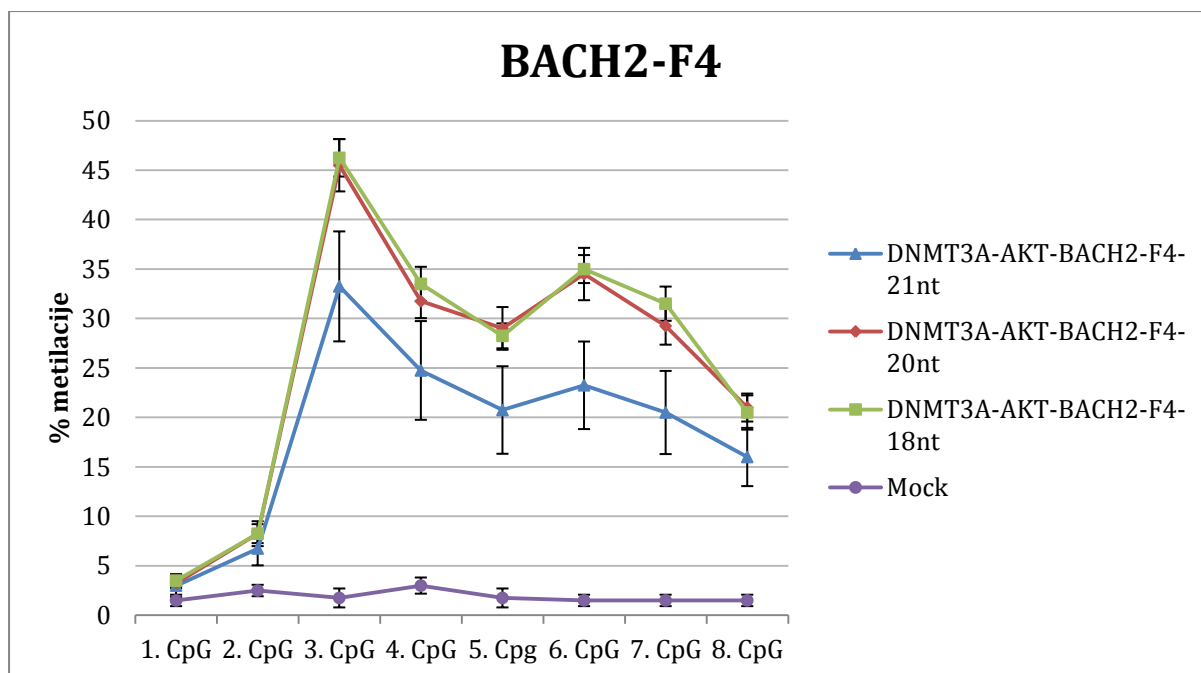
Slika 12. Srednje vrijednosti metilacije CpG mjesta fragmenta A1 gena *MGAT3* stanica HEK293 transfeciranih plazmidnim vektorom koji kodira za fuzijski konstrukt dCas9-TET1 za demetilaciju gdje su konstrukti imali nespecifičnu sgRNA dugačku 21, 20 i 18 nukleotida. „Mock“ prikazuje srednje vrijednosti metilacije fragmenta A1 gena *MGAT3* stanica HEK293 transfeciranih bez plazmidne DNA. Raspon pogreške (engl. „error bar“) prikazuje standardnu devijaciju.



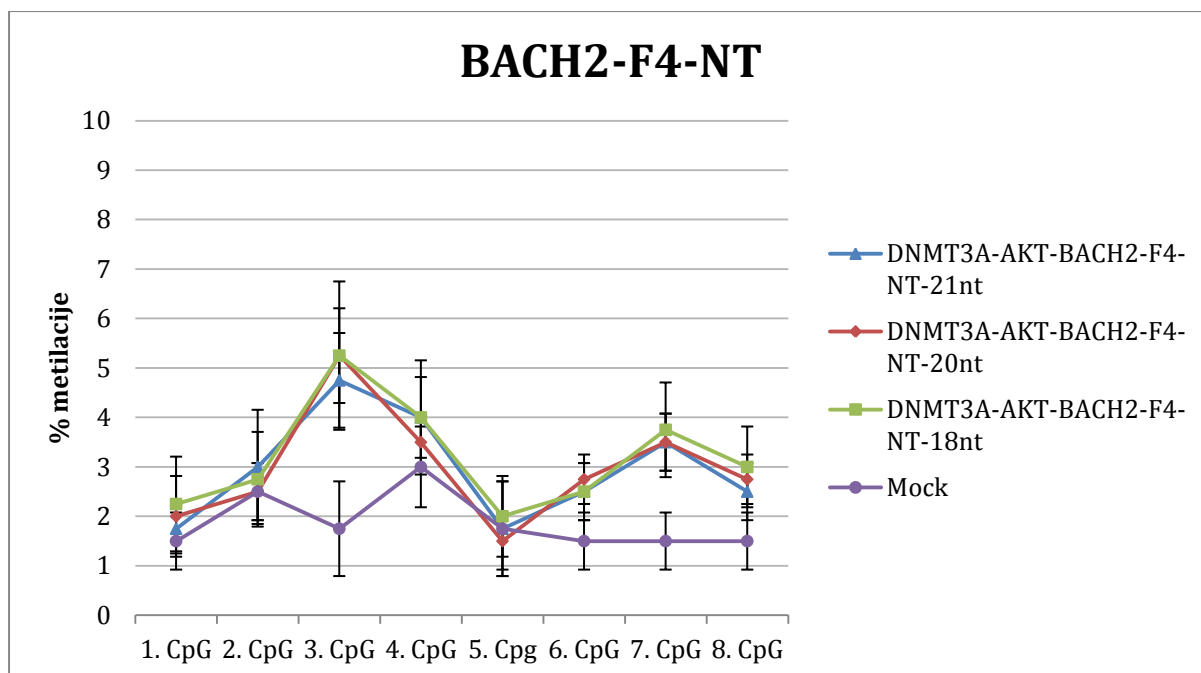
Slika 13. Srednje vrijednosti metilacije CpG mjesta fragmenta F4 gena *BACH2* stanica HEK293 transfeciranih plazmidnim vektorom koji kodira za fuzijski konstrukt dCas9-DNMT3A za metilaciju sa sgRNA od 21, 20 i 18 nukleotida. „Mock“ prikazuje srednje vrijednosti metilacije fragmenta F3 gena *BACH2* stanica HEK293 transfeciranih bez plazmidne DNA. Raspon pogreške (engl. „error bar“) prikazuje standardnu devijaciju.



Slika 14. Srednje vrijednosti metilacije CpG mjesta fragmenta F3 gena *BACH2* stanica HEK293 transfeciranih plazmidnim vektorom koji kodira za fuzijski konstrukt dCas9-DNMT3A za metilaciju gdje su konstrukti imali nespecifičnu sgRNA dugačku 21, 20 i 18 nukleotida. „Mock“ prikazuje srednje vrijednosti metilacije fragmenta F3 gena *BACH2* stanica HEK293 transfeciranih bez plazmidne DNA. Raspon pogreške (engl. „error bar“) prikazuje standardnu devijaciju.

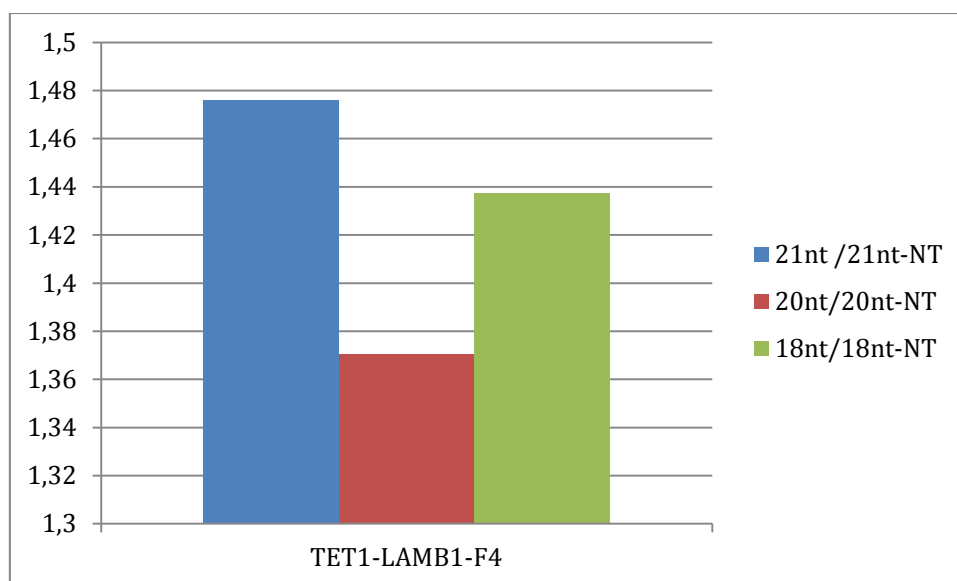


Slika 15. Srednje vrijednosti metilacije CpG mjesta fragmenta F4 gena *BACH2* stanica HEK293 transfeciranih plazmidnim vektorom koji kodira za fuzijski konstrukt dCas9-DNMT3A za metilaciju sa duljinama sgRNA od 21, 20 i 18 nukleotida. „Mock“ prikazuje srednje vrijednosti metilacije fragmenta F4 gena *BACH2* stanica HEK293 transfeciranih bez plazmidne DNA. Raspon pogreške (engl. „error bar“) prikazuje standardnu devijaciju.

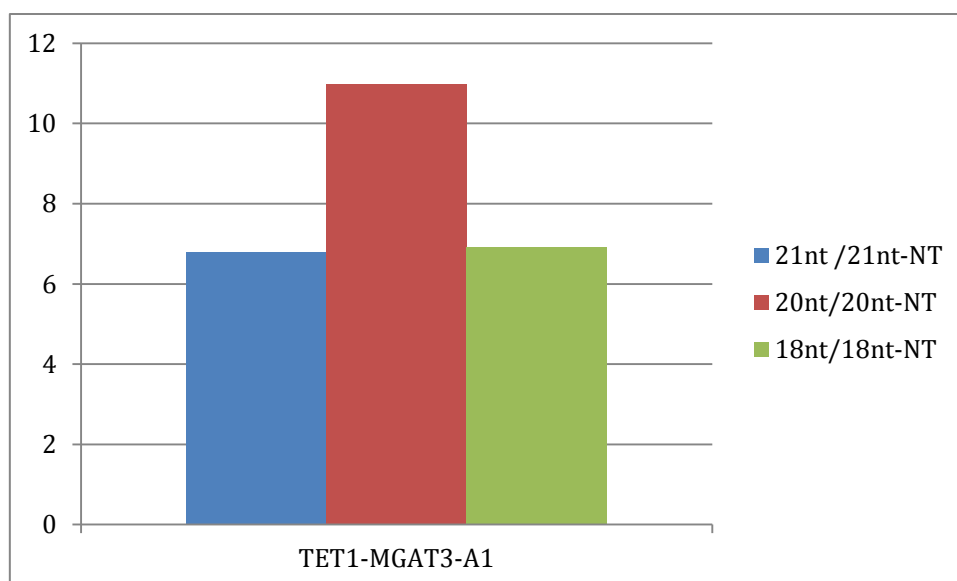


Slika 16. Srednje vrijednosti metilacije CpG mjesta fragmenta F4 gena *BACH2* stanica HEK293 transfeciranih plazmidnim vektorom koji kodira za fuzijski konstrukt dCas9-DNMT3A za metilaciju gdje su konstrukti imali nespecifičnu sgRNA dugačku 21, 20 i 18 nukleotida. „Mock“ prikazuje srednje vrijednosti metilacije fragmenta F4 gena *BACH2* stanica HEK293 transfeciranih bez plazmidne DNA. Raspon pogreške (engl. „error bar“) prikazuje standardnu devijaciju.

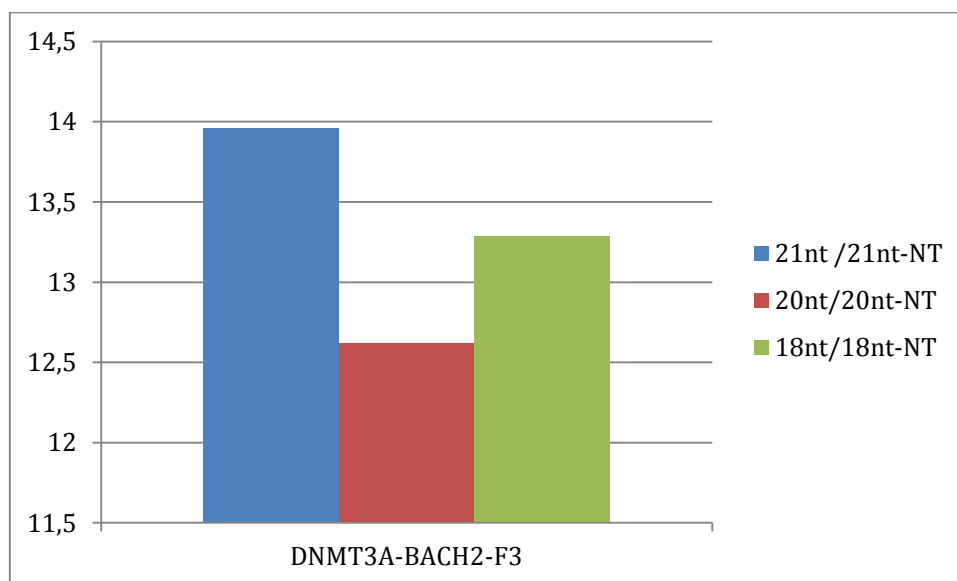
Napravljena je usporedba omjera specifične aktivnosti u odnosu na „Mock“ s nespecifičnom aktivnosti u odnosu na „Mock“ različitih duljina sgRNA za svaki gen. Omjer je dobiven usporedbom specifične aktivnosti i nespecifične aktivnosti za svaki ciljani gen. Specifična aktivnost dobivena je kao razlika ukupne aktivnosti enzima u stanicama gdje su fuzijski konstrukti ciljali gene i ukupne aktivnosti kontrolnih stanica transfeciranih bez plazmidne DNA („Mock“). Nespecifična aktivnost dobivena je oduzimanjem ukupne aktivnosti enzima u stanicama sa kontrolnim sgRNA („non-targeting“, NT) od ukupne aktivnosti kontrolnih stanica transfeciranih bez plazmidne DNA („Mock“). Najpovoljniji omjer specifične (što veća) i nespecifične aktivnosti (što manja) za ciljanu demetilaciju fragmenta F4 gena *LAMB1* utvrđen je za sgRNA od 21 nukleotida (Slika 17), a za ciljanu demetilaciju fragmenta A1 promotora gena *MGAT3* najbolji omjer je utvrđen za sgRNA od 20 nukleotida (Slika 18). Za fragment F3 gena *BACH2* najpovoljniji omjer specifične i nespecifične aktivnosti utvrđen je za sgRNA od 21 nukleotida (Slika 19), dok je za fragment F4 gena *BACH2* najpovoljniji omjer utvrđen za sgRNA od 20 nukleotida (Slika 20).



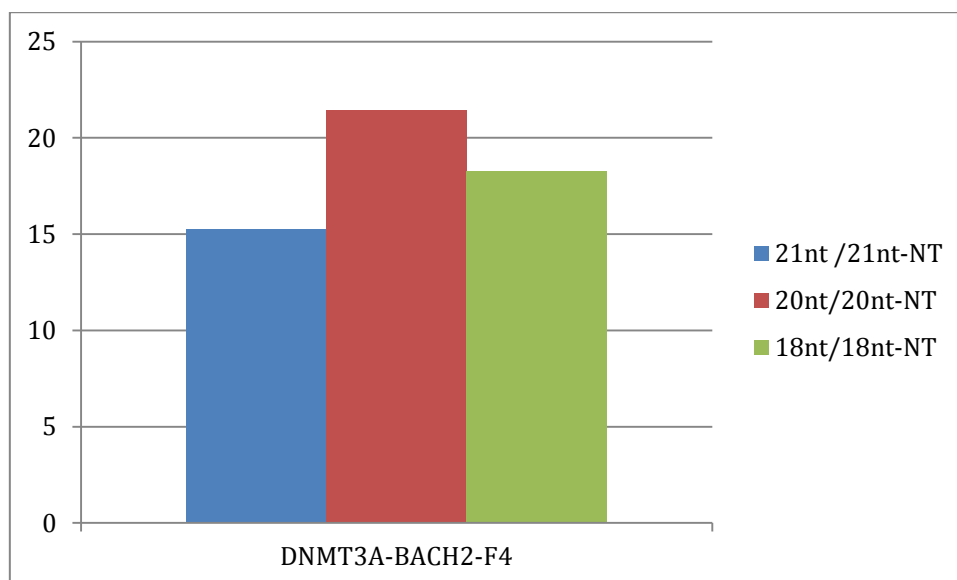
Slika 17. Usporedbe omjera specifične i nespecifične aktivnosti za fuzijski konstrukt dCas9-TET1 za demetilaciju sa duljinama sgRNA od 21, 20 i 18 nukleotida za fragment F4 gena *LAMB1*. Prikazani su omjeri specifične i nespecifične (NT) aktivnosti demetilacije sa sgRNA duljine od 21 (21nt/21nt-NT, plavo), 20 (20nt/20nt-NT, crveno) i 18 (18nt/18nt-NT) nukleotida.



Slika 18. Usporedbe omjera specifične i nespecifične aktivnosti za fuzijski konstrukt dCas9-TET1 za demetilaciju sa duljinama sgRNA od 21, 20 i 18 nukleotida za fragment A1 promotora gena *MGAT3*. Prikazani su omjeri specifične i nespecifične (NT) aktivnosti demetilacije sa sgRNA duljine od 21 (21nt/21nt-NT, plavo), 20 (20nt/20nt-NT, crveno) i 18 (18nt/18nt-NT) nukleotida.



Slika 19. Usporedbe omjera specifične i nespecifične aktivnosti za fuzijski konstrukt dCas9-DNMT3A za metilaciju sa duljinama sgRNA od 21, 20 i 18 nukleotida za fragment F3 gena *BACH2*. Prikazani su omjeri specifične i nespecifične (NT) aktivnosti metilacije sa sgRNA duljine od 21 (21nt/21nt-NT, plavo), 20 (20nt/20nt-NT, crveno) i 18 (18nt/18nt-NT) nukleotida.



Slika 20. Usporedbe omjera specifične i nespecifične aktivnosti za fuzijski konstrukt dCas9-DNMT3A za metilaciju sa duljinama sgRNA od 21, 20 i 18 nukleotida za fragment F4 gena *BACH2*. Prikazani su omjeri specifične i nespecifične (NT) aktivnosti metilacije sa sgRNA duljine od 21 (21nt/21nt-NT, plavo), 20 (20nt/20nt-NT, crveno) i 18 (18nt/18nt-NT) nukleotida.

5. RASPRAVA

Sustav CRISPR/Cas9 adaptivni je imunski sustav prokariota. U genetičkom inženjerstvu koristi se za ciljanu izmjenu genoma. Veliki problem sustava CRISPR/Cas9 za ciljano modificiranje genoma je njegovo nespecifično vezanje i aktivnost na neželjenim mjestima u genomu (engl. "off-target"). Neželjena nespecifična aktivnost može dovesti do promjena funkcionalnosti i ekspresiji gena koje mogu rezultirati malignim fenotipom. Zbog toga je važno svesti nespecifičnu aktivnost na što je moguće manju razinu. Molekula sgRNA sadrži sržnu regiju (engl. "seed region") duljine 12 nukleotida koja se nalazi neposredno uz sekvencu PAM. Nekomplementarno sparivanje baza ciljane sekvence DNA i sgRNA ne tolerira se unutar sržne regije, jer onemogućava konformacijsku promjenu u proteinu Cas9 nužnu za učinkovito vezanje supstrata. Ostatak sekvence na 5' kraju molekule sgRNA (izvan sržne regije) može uspješno naciľjati određenu genomsku regiju i uz određen broj nekomplementarnih baza (do 4) (Larson i sur., 2013). Prethodna istraživanja pokazala su da se skraćivanjem sgRNA može postići povećana učinkovitost fuzijskog konstrukta te u isto vrijeme smanjiti nespecifičnu aktivnost. Skraćene sgRNA su osjetljivije na nekomplementarno sparivanje baza zbog smanjene energije vezanja sgRNA za ciljnu sekvencu na molekuli DNA. Upravo ta destabilizacija kompleksa Cas9/sgRNA/DNA izazvana molekulom sgRNA skraćenom na 5' kraju pokazala se uspješnom u smanjivanju nespecifičnog vezanja, dok specifično vezanje nije bilo bitno smanjeno (Fu i sur., 2014). Skraćivanje molekule sgRNA na manje od 17 komplementarnih nukleotida na 5' kraju potpuno je onemogućilo vezanje Cas9 na DNA (Fu i sur., 2014). Uz skraćivanje komplementarnog dijela sgRNA molekule na 17 nukleotida, dodatak jednog nekomplementarnog gvanina na sam 5' kraj dodatno je povećao specifičnost vezanja (i smanjio nespecifičnu aktivnost) bez neželjenog gubitka specifične aktivnosti. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kako skraćivanje molekule sgRNA utječe na učinkovitost i specifičnost fuzijskih konstrukata za promjenu statusa metilacije dCas9-DNMT3A i dCas9-TET1. Dodatni cilj bio je provjeriti može li se pristup skraćene sgRNA pokazan na proteinu Cas9 iz bakterije *Streptococcus pyogenes* podjednako uspješno primijeniti na ortolog Cas9 iz bakterije *Staphylococcus aureus*.

Pirosekvenciranje je pokazalo statistički značajne promjene u srednjim vrijednostima metilacije CpG mjesta u stanicama u kojima su korišćeni fuzijski konstrukti u odnosu na stanice transfecirane bez plazmidne DNA („Mock“). Promjene su utvrđene kod svih fuzijskih konstrukata čije su sgRNA imale ciljnu sekvencu u genomu. Kod fuzijskih konstrukata čije

sgRNA nisu imale ciljane sekvence u genomu („*non-targeting*“) u odnosu na stanice transfecirane bez dodavanja plazmidne DNA utvrđene su statistički značajne promjene u srednjim vrijednostima metilacije, osim kod fragmenta A1 promotora gena *MGAT3*. Fuzijski konstrukti sa skraćenom sgRNA od 20 i 18 nukleotida nisu statistički značajno aktivniji od fuzijskog konstrukta sa sgRNA od 21 nukleotida za niti jedan promatrani gen. Nije uočeno niti jedno statistički značajno smanjenje neželjene nespecifične aktivnosti fuzijskih konstrukata korištenjem skraćenih sgRNA od 20 i 18 nukleotida.

Niti jedna od skraćenih molekula sgRNA nije dovela niti do povećanja aktivnosti niti do smanjenja nespecifičnog vezanja. Sve vrijednosti metilacije promatranih CpG mjesta negativnih kontrola (stanica HEK293 transfeciranih bez plazmidne DNA, engl „*Mock*“) odgovaraju vrijednostima metilacije netretiranih stanica (Uspoređeno s vrijednostima na stranici <https://genome.ucsc.edu/>, Human Assembly Feb. 2009 (GRCh37/hg19) St1, RRBS, ENCODE/HudsonAlpha).

Moguće je da različita pozicija ciljane sekvence u genomu i njena pristupačnost utječu na to kako će fuzijski konstrukt interagirati s njom. Efikasnost sustava uvjetovana je i veličinom i vrstom fuzionirane domene te njenim steričkim pozicioniranjem na proteinu za navođenje. Kako bi se poboljšala svojstva svakog fuzijskog konstrukta, biti će potrebno kombinirati više različitih strategija.

Osim skraćivanja sgRNA, smanjenju nespecifične aktivnosti moguće je pristupiti i korištenjem slabijeg promotora za sgRNA kao što je promotor H1. Time se smanjuje koncentracija kompleksa Cas9/sgRNA u stanici što rezultira smanjenom neželjenom aktivnošću (Ranganathan i sur., 2014). Nadalje, kod dizajna sgRNA bitno je da se sekvenca razlikuje od drugih mjesta u genomu za barem 2 ili 3 nukleotida. Dodavanje dodatnih gvanina 5' kraju kod promotora U6 također povećava specifičnost vezanja molekule sgRNA za ciljnu sekvencu (Sander i Joung, 2014).

Pretpostavlja se da je nespecifičnost divljeg tipa proteina Cas9 nastala kako bi se spriječilo da ga virusi izbjegnu. Zbog toga je pogodan za obranu bakterijskog genoma, ali ne i za uređivanje genoma eukariotskih stanica. Ta nespecifičnost se može smanjiti stvaranjem rekombinantnih proteina Cas9, uvođenjem nasumičnih mutacija u željenu domenu te selekcijom onih mutanata koji pokazuju najpoželjnija svojstva. Primjer takvog rekombinantnog proteina je xCas9, dobiven metodom kontinuirane evolucije pomoću faga PACE (engl. *Phage-assisted continuous evolution*) u bakteriji *E. coli*. Karakterizira ga mogućnost prepoznavanja velikog broja sekvenci PAM što omogućava veći broj ciljnih mjesta u genomu i lakše dizajniranje molekula sgRNA te povećana specifična i smanjena

nespecifična aktivnost (Hu i sur., 2018). Drugi takav rekombinantni protein Cas9 je protein evoCas9, dobiven mutacijama u domeni REC3. Domena REC3 odabrana je zbog svojih interakcija s heterodupleksima sgRNA i ciljnom DNA. Selekcijom u kvascima utvrđene su mutacije koje su dovele do najvećeg smanjenja nespecifične aktivnosti, bez smanjenja specifične aktivnosti (Casini i sur., 2018).

Alternativa transfekciji plazmidima je korištenje ribonukleoproteinskih kompleksa Cas9-sgRNA, za koje je pokazano da imaju manju nespecifičnu aktivnost te uzrokuju manji stres za stanicu. Ribonukleoproteinski kompleksi Cas9-sgRNA modificiraju željeno mjestu u genomu te se potom razgrađuju endoprotezama zbog čega je smanjeno nespecifično djelovanje. Velika prednost u odnosu na plazmidnu dostavu sustava je i izbjegnuta mogućnost neželjene integracije plazmidne DNA u genom. Ovakvi ribonukleoproteinski kompleksi mogu se dostaviti u stanice elektroporacijom, lipofekcijom ili proteinskom transdukcijom (Koo i sur., 2015). Još jedna od prednosti je mogućnost korištenja kemijski sintetiziranih sgRNA. Ugradnja 2'-*O*-metil-3'-fosfonoacetata na odabrana mjesta u molekuli sgRNA može dovesti do smanjenja nespecifičnog vezanja u genomu (Ryan i sur., 2018).

Da bi bili što sigurniji da je nespecifična aktivnost minimalna, potrebno je koristiti i različite metode njene detekcije. U ovom istraživanju nije provjeravana metilacija cjelokupnog genoma, već samo promatranih gena. Za provjeru metiliranosti cjelokupnog genoma koriste se metode MethylC-seq ili RRBS (*reduced representation bisulfite sequencing*) (Kurdyukov i Bullock, 2016).

Skraćivanjem duljine molekule sgRNA moguće je postići povećanje aktivnosti i smanjenje nespecifičnog vezanja fuzijskih konstrukata, no ovaj pristup funkcionira samo u određenim slučajevima. Fu i suradnici (2014) su za određene gene postigli do 5000 puta veću specifičnost bez gubitka u aktivnosti konstrukta. U skladu s tim rezultatima, očekivali smo smanjenje nespecifične aktivnosti naših konstrukata. Nažalost, niti jedna od naših sgRNA nije dovela do statistički značajnog povećanja specifičnosti. Usprkos tome što skraćivanje sgRNA nije rezultiralo statistički značajnim povećanjem specifičnosti, napravljena je usporedba omjera specifične i nespecifične aktivnosti kako bi se utvrdilo koje su sgRNA optimalne za svaki pojedini gen. Utvrđeno je da je duljina sgRNA od 21 nukleotida za fragment F4 gena *LAMB1* te za fragment F3 gena *BACH2* najoptimalnija, zbog čega će se nastaviti koristiti za njihovu ciljanu demetilaciju, odnosno metilaciju u budućim eksperimentima. Skraćene sgRNA koje će se koristiti u budućim eksperimentima biti će sgRNA od 20 nukleotida koja cilja promotor gena *MGAT3* te skraćena sgRNA od 20 nukleotida za fragment F4 gena *BACH2*. Najlošiji omjeri utvrđeni su kod sgRNA za fragment

gena *LAMBI*, gdje se specifična i nespecifična aktivnost konstrukata ne razlikuju pretjerano u usporedbi sa omjerima specifične i nespecifične aktivnosti kod ostalih ciljanih gena.

Na temelju rezultata ovog istraživanja zaključeno je da skraćivanje duljine molekule sgRNA ne smanjuje nespecifičnu aktivnost konstrukata za ciljanu metilaciju/demetilaciju DNA, što je u suprotnosti sa našim predviđanjima. Također je zaključeno da skraćivanje molekula sgRNA nije rezultiralo promjenom specifične aktivnosti korištenih fuzijskih konstrukata. Nije utvrđen veći utjecaj skraćivanja molekula sgRNA na nespecifičnu aktivnost u odnosu na specifičnu aktivnost. Kako bi se poboljšala svojstva fuzijskih konstrukata za ciljanu metilaciju, odnosno demetilaciju, biti će potrebno kombinirati više različitih strategija povećanja specifične aktivnosti i smanjenja nespecifične aktivnosti.

6. ZAKLJUČAK

- Molekule sgRNA od 21, 20 i 18 nukleotida uspješno su klonirane u plazmidne vektore s fuzijskim konstruktima dCas9-DNMT3A i dCas9-TET1
- Stanice HEK293 uspješno su transfecirane plazmidnim konstruktima za ciljanu metilaciju gena *BACH2* te za ciljanu demetilaciju gena *LAMB1* i *MGAT3*
- Ukupna genomska DNA je bisulfitno konvertirana i umnožena lančanom reakcijom polimeraze
- Pirosekvenciranjem je određena razina metilacije
- Optimalna duljina molekule sgRNA za ciljanje gena *LAMB1* i fragment F3 gena *BACH2* je 21 nukleotid
- Optimalna duljina molekule sgRNA za ciljanje gena *MGAT3* je 20 nukleotida
- Skraćivanje molekula sgRNA nije dovelo do statistički značajnog smanjenja nespecifične aktivnosti
- Skraćivanje molekula sgRNA nije imalo veći utjecaj na nespecifičnu aktivnost u odnosu na specifičnu aktivnost

7. LITERATURA

1. Brocken D. J. W., Tark-Dame M., Dame R. T. (2018): dCas9: A Versatile Tool for Epigenome Editing. *Current Issues in Molecular Biology* **26**: 15–32.
2. Casini A., Olivieri M., Petris G., Montagna C., Reginato G., Maule G., Lorenzin F., Prandi D., Romanel A., Demichelis F., Inga A., Cereseto A. (2018): A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast. *Nature Biotechnology* **36(3)**: 265–271.
3. Deaton A. M., Bird A. (2011): CpG islands and the regulation of transcription. *Genes and Development* **25(10)**: 1010–1022.
4. Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K. (2012): Functional Diversity of Laminins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28(1)**: 523–553.
5. Fu Y., Sander J. D., Reyon D., Cascio V. M., Joung K. (2014): Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology* **32(3)**: 279–284.
6. Hu J. H., Miller S. M., Geurts M. H., Tang W., Chen L., Sun N., Zeina C. M., Gao X., Rees H. A., Lin Z., Liu D. R. (2018): Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* **556(7669)**: 57–63.
7. Kohli R. M., Zhang Y. (2013): TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **502(7472)**: 472–479.
8. Kometani K., Nakagawa R., Shinnakasu R., Kaji T., Rybouchkin A., Moriyama S., Furukawa K., Koseki H., Takemori T., Kurosaki T. (2013): Repression of the Transcription Factor Bach2 Contributes to Predisposition of IgG1 Memory B Cells toward Plasma Cell Differentiation. *Immunity* **39(1)**: 136–147.
9. Koo T., Lee J., Kim J.-S. (2015): Measuring and Reducing Off-Target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9. *Molecules and Cells* **38(6)**: 475–481.

10. Kurdyukov S., Bullock M. (2016): DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology* **5**(1): 3.
11. Larson M. H., Gilbert L. A., Wang X., Lim W. A., Weissman J. S., Qi L.S. (2013): CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nature Protocols*. **8**(11): 2180-96.
12. Lauberth S. M., Nakayama T., Wu X., Ferris A. L., Tang Z., Hughes S. H., Roeder R. G. (2013): H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. *Cell* **152**(5): 1021–1036.
13. Lauc G., Huffman J. E., Pučić M., Zgaga L., Adamczyk B., Mužinić A., Novokmet M., Polašek O., Gornik O., Krištić J., Keser T., Vitart V., Scheijen B., Uh H.-W., Molokhia M., Patrick A. L., McKeigue P., Kolčić I., Lukić I. K., Swann O., van Leeuwen F. N., Ruhaak L. R., Houwing-Duistermaat J. J., Slagboom P. E., Beekman M., de Craen A. J. M., Deelder A. M., Zeng Q., Wang W., Hastie N. D., Gyllenstein U., Wilson J. F., Wuhrer M., Wright A. F., Rudd P. M., Hayward C., Aulchenko Y., Campbell H., Rudan I. (2013): Loci Associated with N-Glycosylation of Human Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. *PLoS Genetics* **9**(1).
14. Lyko F. (2018): The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics* **19**(2): 81–92.
15. Nishimasu H, Cong L., Yan W. X., Ran F. A., Zetsche B., Li Y., Kurabayashi A., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. (2015): Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell* **162**(5): 1113-1126.
16. Portela A., Esteller M. (2010): Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology* **28**(10): 1057–1068.
17. Ranganathan V., Wahlin K., Maroutti J., Zack D.J. (2014): Expansion of the CRISPR-Cas9 genome targeting space through the use of H1 promoter-expressed guide RNAs. *Nature Communications* **5**: 1–8.

18. Sander J. D., Joung J. K. (2014): CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology* **32(4)**: 347–350.
19. Shinnakasu R., Inoue T., Kometani K., Moriyama S., Adachi Y., Nakayama M., Takahashi Y., Fukuyama H., Okada T., Kurosaki T. (2016): Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nature Immunology* **17(7)**: 861-869.
20. Takahashi, M., Kuroki Y., Ohtsubo K., Taniguchi N. (2009): Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins. *Carbohydrate Research* **344(12)**: 1387–1390.
21. Vojta A., Dobrinić P., Tadić V., Bočkor L., Korać P., Julg B., Klasić M., Zoldoš V. (2016): Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Research* **44(12)**: 5615–5628.
22. Wright A. V., Nuñez J. K., Doudna J. A. (2016): Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature’s Toolbox for Genome Engineering. *Cell* **164(1–2)**: 29–44.
23. Ran F. A., Hsu P. D., Wright J., Agarwala V., Scott D. A., Zhang F. (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* **8(11)**: 2281–2308.
24. Ran F. A., Cong L., Yan W. X., Scott D. A., Gootenberg J. S., Kriz A. J., Zetsche B., Shalem O., Wu X., Makarova K. S., Koonin E. V., Sharp P. A., Zhang F. (2015): In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **520(7546)**: 186–191.
25. Ryan D. E., Taussig D., Steinfeld I., Phadnis S. M., Lunstad B. D., Singh M., Dellinger D. J. (2018): Improving CRISPR–Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs. *Nucleic Acids Research* **46(2)**: 792–803.
26. Wu X, Zhang Y. (2017): TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics* **18(9)**: 517–534.

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Ime i prezime: Stjepan Rakitić
Datum i mjesto rođenja: 09.12.1993., Vinkovci

OBRAZOVANJE

rujan 2016.-sada	Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Diplomski studij molekularne biologije
rujan 2012.-rujan 2016.	Sveučilište u Osijeku, Odjel za biologiju, Preddiplomski studij biologije (Sveučilišni prvostupnik biologije)
rujan 2008.-lipanj 2012.	Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci, opći smjer

PROJEKTI

prosinac 2017.-travanj 2018. Diplomski rad na Zavodu za molekularnu biologiju,
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
(Utjecaj duljine molekule sgRNA na učinkovitost i specifičnost
proteina Cas9 iz vrste *Staphylococcus aureus*)